

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

**Caractérisation immunologique et immunochimique d'un antigène  
de la muqueuse de l'intestin grêle de souris et de cobaye.**

par



**Normand Després**

Département d'anatomie et de biologie cellulaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine  
en vue de l'obtention du grade  
de maître ès sciences (M.Sc.)

Juin 1989



National Library  
of Canada

Bibliothèque nationale  
du Canada

Canadian Theses Service    Service des thèses canadiennes

Ottawa, Canada  
K1A 0N4

The author has granted an irrevocable non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of his/her thesis by any means and in any form or format, making this thesis available to interested persons.

The author retains ownership of the copyright in his/her thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without his/her permission.

L'auteur a accordé une licence irrévocable et non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de sa thèse de quelque manière et sous quelque forme que ce soit pour mettre des exemplaires de cette thèse à la disposition des personnes intéressées.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège sa thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

ISBN 0-315-54743-X

## RÉSUMÉ

**CARACTÉRISATION IMMUNOLOGIQUE ET IMMUNOCHIMIQUE D'UN ANTIGÈNE DE LA MUQUEUSE DE L'INTESTIN GRÊLE DE SOURIS ET DE COBAYE.**

**Normand DESPRES, département d'anatomie et de biologie cellulaire, Faculté de médecine, Université de Sherbrooke.**

Des cobayes ont été immunisés avec un antigène extrait de la muqueuse de l'intestin grêle (PI) isologue, de même que des souris consanguines avec PI isologue ou autologue. Cet antigène est émulsifié au préalable dans de l'adjuvant complet de Freund (ACF). Des niveaux détectables d'anticorps anti-PI sont observés après deux doses de l'immunogène. Des études plus approfondies chez des souris consanguines ont révélé un degré de susceptibilité lié à l'haplotype respectif de ces souris. Des souris BALB/c (H-2<sup>d</sup>) et C57bl/6 (H-2<sup>b</sup>) ont été immunisées avec une ou deux doses de PI isologue ou autologue. Dans les deux souches de souris, une seule dose de PI induit une synthèse marginale d'anticorps anti-PI, révélé par ELISA. Les souris BALB/c ayant reçu deux doses de PI produisent des niveaux détectables d'anticorps anti-PI, à différence des souris C57bl/6 immunisées de la même façon. De plus, les souris BALB/c immunisées avec du PI autologue révèlent une réponse humorale similaire au groupe de souris BALB/c alloimmunisées. Ces résultats supportent la possibilité d'un contrôle génétique de la susceptibilité des souris BALB/c et C57bl/6 à répondre à l'allo- ou à l'autoimmunisation avec PI. La synthèse d'anticorps anti-PI chez les souris BALB/c susceptibles et C57bl/6 résistantes, semblent en relation avec la dose et le nombre d'injections de l'immunogène. L'électrophorèse SDS-PAGE de PI, foie et rein de cobaye ou de souris,



révèle deux bandes polypeptidiques spécifiques à PI de cobaye ayant des poids moléculaires (P.M.) de 30 Kd et 46 Kd et deux bandes spécifiques à PI de souris possédant des P.M. inférieurs à 17 Kd. Des sérums hétérologues de lapins anti-PI de cobaye et de souris, et la fraction globulinique de ces sérums, ont démontré peu de réactions croisées entre les PI de sources xénogéniques, tandis que certains degrés de réactions croisées sont observées entre PI et les extraits salins de foie et de rein isologues, lors de l'analyse par ELISA. Des absorptions de l'anti-PI de cobaye et de souris avec des lyophilisats d'organes isologues ont permis de démontrer la spécificité face à l'antigène PI, en éliminant les réactions croisées avec ces extraits d'organes. L'analyse par immunotransfert du sérum hétérologue anti-PI de cobaye absorbé avec des lyophilisats d'organes isologues, de la fraction globulinique de ce sérum, ainsi que des sérums isologues, incubés avec PI de cobaye et avec des extraits salins de foie et de rein isologues révèlent deux bandes spécifiques à PI de 30 et 46 Kd, tel qu'identifiées par SDS-PAGE. L'analyse par immunotransfert du sérum hétérologue anti-PI de souris absorbé ou non, de la fraction globulinique, de même que des sérums isologues et autologues de souris BALB/c, révèle deux bandes PI-spécifiques clairement identifiées par SDS-PAGE, ayant des P.M. de 10 et 8 Kd.

**SOMMAIRE**

La maladie de Crohn et la colite ulcéro-hémorragique sont des maladies inflammatoires non-spécifiques de l'intestin (IBD) ayant une incidence croissante dans le monde industrialisé. L'étiologie des IBD reste inconnue, quoique certaines altérations immunologiques sont compatibles avec l'existence d'un syndrome autoimmun.

Une entérocolite autoimmune expérimentale (ECA), a été induite initialement chez le cobaye par alloimmunisations, utilisant comme immunogène, un antigène extrait au niveau de la muqueuse de l'intestin grêle isologue (PI), émulsifié dans de l'adjuvant complet de Freund (ACF). Des résultats similaires ont été obtenus chez des souris BALB/c par des cédules d'immunisation avec du PI isologue ou autologue. Des niveaux détectables d'anticorps anti-PI sont observés après deux doses de l'immunogène lors de l'induction de la ECA. Des études plus approfondies chez des souris consanguines ont révélé un état de susceptibilité lié à l'haplotype respectif de ces souris. Des souris BALB/c (H-2<sup>d</sup>) et C57bl/6 (H-2<sup>b</sup>) ont été immunisées avec une ou deux doses de PI isologue ou autologue. Dans les deux souches de souris, une seule dose de PI induit une synthèse marginale d'anticorps anti-PI, révélé par ELISA. Les souris BALB/c ayant reçu deux doses de l'immunogène, puis saignées 60 jours après le début des immunisations, produisent des niveaux détectables d'anticorps anti-PI, à différence des souris C57bl/6 immunisées de la même façon. De plus, les souris BALB/c immunisées avec du PI autologue révèlent une réponse

humorale similaire au groupe de souris BALB/c alloimmunisées. Ces résultats supportent la possibilité d'un contrôle génétique de la susceptibilité des souris BALB/c et C57bl/6 à développer la ECA. La réponse semble en relation avec la dose et le nombre d'injections de l'immunogène.

L'antigène PI a été caractérisé par électrophorèse SDS-PAGE, ELISA et immunotransfert. L'électrophorèse SDS-PAGE de PI, de foie et de rein de cobaye révèle deux bandes polypeptidiques spécifiques à PI, et d'autres bandes partagées avec les extraits de foie et de rein isologues. Les bandes spécifiques ont des poids moléculaires de 30 Kd et 46 Kd respectivement. L'électrophorèse SDS-PAGE de PI, de foie et de rein de souris BALB/c et CD-1 révèle également la présence de deux bandes spécifiques à PI de souris qui possèdent des poids moléculaires respectifs inférieurs à 17 Kd.

Des sérums hétérologues anti-PI de cobaye et de souris, ainsi que la fraction globulinique de ces sérums, ont été obtenus chez le lapin. Les sérums hétérologues anti-PI de cobaye et de souris démontrent qu'il existe peu de réactions croisées entre les PI de sources xénogéniques, tandis que certains degrés de réactions croisées sont observées entre le PI et les extraits salins de foie et de rein isologues, lors de l'analyse par ELISA. Le sérum hétérologue anti-PI de cobaye révèle un haut degré de réactions croisées avec les extraits salins de foie et de rein isologues. Des protocoles

d'absorptions multiples de l'anti-PI de cobaye avec des lyophilisats de foie et de rein isologues ont permis de démontrer la spécificité face à l'antigène PI en éliminant les réactions croisées avec ces extraits d'organes. De multiples absorptions avec l'extrait de foie réduisent la réactivité avec PI. Avec l'extrait de rein isologue, la réactivité est considérablement réduite.

Le sérum hétérologue anti-PI de souris montre un degré moindre de réactions croisées entre le PI et les extraits salins d'organes isologues. Des protocoles d'absorption du sérum hétérologue et de la fraction globulinique anti-PI de souris avec les lyophilisats de foie et de rein isologues, révèlent une inhibition similaire des anticorps anti-PI, tout en conservant un haut niveau de réactivité spécifique à l'antigène PI de souris.

L'analyse par immunotransfert du sérum hétérologue anti-PI de cobaye absorbé avec des lyophilisats d'organes isologues ainsi que la fraction globulinique de ce sérum, incubés avec du PI de cobaye, de même qu'avec les extraits salins de foie et de rein isologues montrent deux bandes spécifiques à PI. Ces deux bandes semblent posséder des poids moléculaires de 30 et 46 Kd, tel qu'identifiées par SDS-PAGE. L'analyse par immunotransfert des sérums isologues anti-PI de cobaye montre deux bandes uniques à PI de cobaye, similaires à celles obtenues par SDS-PAGE et par immunotransfert avec le sérum hétérologue et la

fraction globulinique, qui possèdent des poids moléculaires respectifs d'environ 30 et 46 Kd.

L'analyse par immunotransfert du sérum hétérologue anti-PI de souris, indique également un partage antigénique et la présence de déterminants spécifiques à l'antigène PI de souris BALB/c et CD-1. L'étude du sérum hétérologue absorbé ou non et de la fraction globulinique, montre deux bandes PI spécifiques clairement identifiées par SDS-PAGE, ayant des poids moléculaires d'environ 10 et 8 Kd. De plus, l'analyse immunochimique à l'aide des sérums anti-PI de souris isologues et autologues, vient supporter les résultats obtenus antérieurement avec le sérum hétérologue et la fraction globulinique. Des absorptions multiples des sérums isologues n'éliminent aucunement la spécificité face à PI, mais réduisent légèrement la réactivité.

Ces épitopes uniques et PI spécifiques, peuvent être possiblement liés à l'autoantigène impliqué dans cette réponse autoimmune vis-à-vis le PI. Il existe une corrélation directe entre la synthèse de niveaux détectables d'anticorps anti-PI et le développement de la ECA chez les souris BALB/c susceptibles et C57bl/6 résistantes. Finalement, de véritables autoimmunisations chez les souris BALB/c, induisent une réponse immune et une réactivité vis-à-vis certaines bandes polypeptidiques spécifiques, similaire à celles obtenues par des alloimmunisations.

**REMERCIEMENTS**

Je tiens à remercier particulièrement le Dr. M.S. Nemirovsky pour m'avoir dirigé opportunément tout au long de mon projet de maîtrise, par son dévouement, sa disponibilité et sa compréhension. Je le remercie également pour m'avoir laissé une grande autonomie dans ce projet, tout en assurant discrètement mon intégration au domaine de la recherche scientifique.

C'est avec gratitude, que je remercie madame France Navratil pour son assistance technique, qui en plus de m'avoir fait profiter de sa grande expérience, a été une compagne de travail extraordinaire, aidant à la réalisation de cette maîtrise. Je remercie également, madame France Guimond pour avoir soutenu la suite de cette assistance technique.

Mes remerciements vont également à tous les membres du département d'anatomie et de biologie cellulaire, pour leur cordialité et leur gentillesse, sans oublier le Dr. D. Ménard, pour m'avoir dirigé de façon critique dans ce programme.

Merçi à Fernand Racicot, à M. Robert Dumont, ainsi qu'à M. François Cloutier et M. André P. Cartier du centre de l'audiovisuel, pour leur aide intarissable.



Je voudrais remercier l'équipe du laboratoire de Pharmacologie du Dr. P. Sirois, pour son aide, ce qui m'a facilité l'accomplissement de certaines manipulations techniques. Mes remerciements vont également au Dr. R. De Médicis pour son aide au niveau de l'analyse statistique des résultats.

Je remercie sincèrement mes amis Michel Lessard, Youssef Sabeh, France et François Cormier, Julie et André Marcoux et Lyne Bertrand pour leur compréhension et leur support moral irremplaçables.

Et je remercie mesdame Nicole Bédard et Lorraine Laliberté, pour avoir porté un jugement critique sur la rédaction de ce mémoire.

Finalement, une profonde reconnaissance envers mes parents, ainsi que mes frères et leur famille, qui m'ont donné l'amour et la confiance et pour l'importance de leur support.

# TABLE DES MATIÈRES

	PAGES
Résumé	III
Sommaire	VI
Remerciements	XI
Table des matières	XIV
Liste des figures	XVIII
Liste des abréviations	XXIII
 INTRODUCTION	 1
I. Tolérance immunitaire	5
II. Rupture de l'autotolérance	7
III. Autoimmunité	10
3.1 Définition	10
3.2 Les autoanticorps	12
3.3 L'immunité à médiation cellulaire	15
3.4 Maladies autoimmunes	19
3.4.1 Maladies autoimmunes spécifiques d'organe	20
3.4.2 Maladies autoimmunes systémiques	21
IV. Modèles expérimentaux des IBD	22
 MATÉRIELS ET MÉTHODES	 24
I. Animaux utilisés	25
II. Isolation et extraction de l'antigène PI	25

2.1 Obtention des grattages (scrapings)	25
2.2 Préparation des extraits bruts	26
2.3 Chromatographie des extraits bruts	26
III. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)	27
IV. Antisérums anti-PI (hétéro-, iso- et autologues)	30
4.1 Sérums anti-PI hétérologues	30
4.2 Obtention de la fraction globulinique	30
4.3 Sérums anti-PI isologues	32
4.4 Sérums anti-PI autologues	33
V. ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay)	34
- Schéma : 1	37
VI. Analyse par immunotransfert	39
- Schéma : 2	40
<b>RÉSULTATS</b>	<b>44</b>
I. Chromatographie des extraits bruts	45
II. Electrophorèse SDS-PAGE	45
2.1 Analyse électrophorétique de PI de cobaye	46
2.2 Analyse électrophorétique de PI de souris	46
III. ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay)	47
3.1 Sérums anti-PI hétérologues	47
3.1.1 Sérum anti-PI de cobaye	47
3.1.2 Sérum anti-PI de souris	47
3.2 Sérums hétérologues anti-PI absorbés avec des extraits salins d'organes et PI.	48

3.2.1	Sérum anti-PI de cobaye	48
3.2.2	Sérum anti-PI de souris	49
3.3	Fractions globulinique des sérums anti-PI hétérologues	49
3.3.1	Fraction globulinique anti-PI de cobaye	49
3.3.2	Fraction globulinique anti-PI de souris	50
3.4	Sérums anti-PI de cobaye isologues	51
3.5	Sérums anti-PI de souris isologues	51
3.6	Sérums anti-PI de souris autologues	54
IV.	Immunobuvardage	55
4.1	Analyse immunochimique de PI de cobaye	55
4.1.1	Analyse avec le sérum anti-PI de cobaye hétérologue	56
4.1.2	Analyse avec la fraction globulinique du sérum anti-PI de cobaye hétérologue	56
4.1.3	Analyse avec le sérum anti-PI de cobaye hétérologue absorbé avec des extraits d'organes et PI de cobaye.	57
4.1.4	Analyse de PI de cobaye avec les sérums anti-PI de cobaye isologues	58
4.2	Analyse immunochimique de PI de souris	58
4.2.1	Analyse avec le sérum anti-PI de souris hétérologue	59
4.2.2	Analyse avec la fraction globulinique du sérum anti-PI de souris hétérologue	59

4.2.3 Analyse avec le sérum anti-PI de souris hétérologue absorbé avec des extraits d'organes et PI de souris	60
4.2.4 Analyse de PI de souris avec les sérums anti-PI de souris isologues	60
4.2.5 Analyse de PI de souris avec les sérums anti-PI de souris autologues	61
 DISCUSSION	 63
 Conclusion	 84
Figures	90
Références	143

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Profil chromatographique de la fraction microsomale des grattages de la muqueuse d'intestin grêle de cobaye Hartley, sur une colonne de Séphacryl S-200 superfine de 2.6 x 100 cm.

Figure 2: Profil chromatographique de la fraction microsomale des grattages de la muqueuse d'intestin grêle de souris CD-1, sur une colonne de Séphacryl S-200 superfine de 2.6 x 100 cm.

Figure 3: Analyse électrophorétique de PI de cobaye Hartley et des extraits salins de foie et de rein isologues par SDS-PAGE.

Figure 4: Analyse électrophorétique de PI de souris CD-1 et d'extraits salins d'organes isologues par SDS-PAGE.

Figure 5: Dosage immunoenzymatique mesuré par ELISA, du sérum hétérologue anti-PI de cobaye incubé avec du PI isologue et xénogénique (souris CD-1).

Figure 6: Dosage immunoenzymatique mesuré par ELISA, du sérum hétérologue anti-PI de souris incubé avec du PI isologue (CD-1) et xénogénique (cobaye).

Figure 7: Analyse immunoenzymatique mesurée par ELISA, des réactions croisées entre le PI de cobaye Hartley et les extraits salins d'organes isologues.

Figure 8: Analyse immunoenzymatique mesurée par ELISA, du sérum hétérologue anti-PI de cobaye, absorbé avec des lyophilisats de foie, de rein et de PI isologue.

Figure 9: Analyse immunoenzymatique mesurée par ELISA, des réactions croisées entre le PI de souris CD-1 et les extraits salins d'organes isologues.

Figure 10: Analyse immunoenzymatique mesurée par ELISA, du sérum hétérologue anti-PI de souris, absorbé avec des lyophilisats de foie, de rein et de PI isologues.

Figure 11: Analyse immunoenzymatique mesurée par ELISA, de la fraction globulinique du sérum hétérologue anti-PI de cobaye incubée avec du PI isologue.

Figure 12: Analyse immunoenzymatique mesurée par ELISA, de la fraction globulinique du sérum hétérologue anti-PI de souris incubée avec du PI isologue.

Figure 13: Analyse immunoenzymatique mesurée par ELISA, de la fraction globulinique du sérum hétérologue anti-PI de souris absorbée avec des lyophilisats de foie, de rein et de PI isologues.

Figure 14: Analyse immunoenzymatique mesurée par ELISA, des sérums isologues de cobaye Hartley ayant reçu trois doses de PI isologue.

Figure 15: Analyse immunoenzymatique mesurée par ELISA, des sérums des souris BALB/c ayant reçu une seule dose de PI de souris CD-1.

Figure 16: Analyse immunoenzymatique mesurée par ELISA, des sérums des souris C57 black/6 ayant reçu une seule dose de PI de souris CD-1.

Figure 17: Analyse immunoenzymatique mesurée par ELISA, des sérums des souris BALB/c ayant reçu deux doses de PI de souris CD-1.

Figure 18: Analyse immunoenzymatique mesurée par ELISA, des sérums des souris C57 black/6 ayant reçu deux doses de PI de souris CD-1.



Figure 19: Analyse statistique par le test t, de la réponse humorale mesurée par ELISA, des souris BALB/c et C57 black/6 ayant reçu une ou deux doses de PI de souris CD-1.

Figure 20: Analyse statistique par le test t, de la réponse humorale mesurée par ELISA, des souris BALB/c allo- ou autoimmunisées avec deux doses de PI isologue (CD-1) ou autologue (BALB/c).

Figure 21: Analyse immunochimique de PI de cobaye par immunotransfert, avec le sérum hétérologue anti-PI de cobaye.

Figure 22: Analyse immunochimique de PI de cobaye par immunotransfert, avec la fraction globulinique du sérum hétérologue anti-PI de cobaye.

Figure 23: Analyse immunochimique de PI de cobaye avec le sérum hétérologue anti-PI de cobaye absorbé.

Figure 24: Analyse immunochimique de PI de cobaye par immunotransfert, avec les sérums isologues anti-PI de cobaye.

Figure 25: Analyse immunochimique de PI de souris BALB/c et CD-1 par immunotransfert, avec le sérum hétérologue anti-PI de souris.

Figure 26: Analyse immunochimique de PI de souris BALB/c et CD-1 par immunotransfert, avec le sérum hétérologue anti-PI de souris absorbé.

Figure 27: Analyse immunochimique de PI de souris par immunotransfert, avec la fraction globulinique du sérum hétérologue anti-PI de souris.

Figure 28: Analyse immunochimique de PI de souris par immunotransfert, avec les sérums isologues anti-PI de souris.

Figure 29: Analyse immunochimique de PI de souris BALB/c par immunotransfert, avec les sérums autologues anti-PI de souris.

ABRÉVIATIONS

ACF	Adjuvant complet de Freund.
AChR	Récepteur pour l'acétylcholine.
ADCC	Lymphocytotoxicité dépendante d'anticorps.
AEO	Orchite autoimmune expérimentale.
AET	Thyroïdite autoimmune expérimentale.
AIT	Thyroïdite autoimmune.
ANA	Anticorps anti-noyau.
anti-Id	Anticorps anti-Idiotypes.
anti-AChR	Anticorps anti-récepteur de l'acétylcholine.
anti-I-J	Anticorps spécifiques pour les lymphocytes T sup- presseurs.
anti-Leu2	Anticorps anti-Leu2, marqueurs des lymphocytes T suppresseurs.
anti-sm	Anticorps anti-Smith.
APC	Cellules présentant l'antigène. Cellules acces- soires.
CD	Maladie de Crohn.
ConA	Concanavaline A.
ECA	Entérocolite autoimmune expérimentale.
EAE	Encéphalomyélite autoimmune expérimentale.
EAU	Uvéorétinite autoimmune expérimentale.
HLA	Antigènes d'histocompatibilité humains.
IBD	Maladies inflammatoires de l'intestin humain.
IgG	Immunoglobuline de classe "G".

IgM	Immunoglobuline de classe "M".
K	Cellules à activité cytotoxique dépendante d'anticorps.
LPL	Lymphocytes de la Lamina Propria intestinale.
mAb	Anticorps monoclonaux.
MG	Myasthénie gravis.
MHC	Complexe majeur d'histocompatibilité.
NK	Cellule tueuse "naturelle" (natural killer).
PBL	Cellules du sang périphérique.
PHA	Phytohémagglutinine.
PI	Protéine intestinale extraite de la muqueuse de l'intestin grêle.
SLE	Lupus érythémateux systémique.
TB	Test de transformation blastique in vitro.
Th	Lymphocyte T auxiliaire (helper).
Ts	Lymphocyte T supprimeur.
T <sub>4</sub> +	Lymphocyte T auxiliaire/inducteur (helper/inducer).
T <sub>8</sub> +	Lymphocyte T supprimeur/cytotoxique.
T <sub>4</sub> / T <sub>8</sub>	Rapport du pourcentage de lymphocytes T <sub>4</sub> + auxiliaires/inducteurs marqués, avec celui des lymphocytes T <sub>8</sub> + supprimeurs/cytotoxiques marqués avec des anticorps monoclonaux spécifiques.
UC	Colite ulcéro-hémorragique.

## INTRODUCTION

Le terme "maladie inflammatoire de l'intestin (IBD)" décrit deux catégories majeures de maladies gastrointestinales chroniques non-spécifiques (93,94), pouvant être distinguées par des critères cliniques et histopathologiques (191). La première est la maladie de Crohn (CD) ou maladie intestinale granulomateuse (189) pouvant affecter toute partie du tractus gastrointestinal, occupant plus fréquemment la partie terminale de l'iléon (93,161). L'autre est la colite ulcéreuse non-spécifique (UC) (81,88) étant le plus souvent limitée au colon et au rectum. Ces maladies touchent généralement les jeunes et les traitements médicaux sont plus ou moins empiriques (113).

En ce qui a trait à la maladie de Crohn, les lésions inflammatoires sont limitées d'abord aux muqueuses et sous-muqueuses. Ensuite, c'est la paroi entière de l'intestin qui est atteinte, de la muqueuse jusqu'à la séreuse. Le processus inflammatoire a habituellement une distribution discontinue le long des intestins (43,189). Dans le cas de la colite ulcéreuse, les premières lésions inflammatoires se limitent à la muqueuse qui est affectée d'une façon diffuse (92). Dans les deux cas, l'infiltration de cellules inflammatoires mononucléaires dans la Lamina Propria est une caractéristique invariable (173).

Les traits immunologiques majeurs des IBD peuvent être classifiés en six catégories (185):

1. Un nombre plus élevé de lymphocytes, plasmocytes, et de monocytes au niveau de la muqueuse et de la sous-muqueuse

pour la CD (48).

2. Une réponse granulômateuse au niveau des lésions.
3. La présence d'autoanticorps circulants dirigés contre les cellules épithéliales du colon, et qui possèdent des réactivités croisées avec E. coli 014.
4. La présence d'anticorps lymphocytotoxiques circulants.
5. Des lymphocytes du sang périphérique cytotoxiques "in vitro" contre les cellules épithéliales du colon.
6. Des altérations phénotypiques des lymphocytes du sang périphérique et des muqueuses.

L'étiologie de la UC et de la CD reste un énigme majeur en gastroentérologie. Plusieurs agents spécifiques ont été proposés dans leur pathogénèse (20,117), mais sans évidence définitive, incluant bactéries (166), virus (56,12), nutriments (135), agents chimiques (162), réactions immunes (60,61,90,147), etc. Les IBD suscitent un intérêt particulier, puisque leur incidence se situent entre 20-50/10<sup>5</sup> aux Etats-Unis (113). Les études immunologiques impliquent, d'une part, des recherches au niveau des antigènes susceptibles d'être impliqués spécifiquement dans ces maladies (99) et, d'autre part, l'analyse des mécanismes à la base de l'homéostasie immunitaire et de l'immunorégulation (46,93,98,169,178).

Le postulat de base en immunologie impliquant la non-réactivité du système immunitaire face aux antigènes du soi, tel que décrit par Ehrlich au début du 20<sup>e</sup> siècle, est aujourd'hui accepté comme étant l'autotolérance immunitaire et

par conséquent, nécessaire à l'homéostasie de l'organisme. L'autoimmunité implique un état où la tolérance au soi est brisée par des mécanismes variés, ayant comme conséquence la présence de cellules et d'anticorps autoréactifs, capables de causer la maladie (190).

La possibilité d'un processus autoimmun à la base des IBD fut avancée en 1959 par Kirsner et Goldberger (91), qui ont montré la présence d'autoanticorps circulants ou liés à des cellules et un état d'immunité hyperréactive. Ces observations ont également été confirmées par plusieurs chercheurs (23,24, 25,142,219). La mise en évidence d'autoanticorps contre les composantes cytoplasmiques des cellules épithéliales du colon dans le sérum de patients atteints d'IBD (24,95,96,97), réaffirme l'implication possible de processus autoimmuns. Du point de vue expérimental, des entérocolites autoimmunes (ECA) ont été obtenues chez le rat (152,153), le cobaye (126) et la souris (6,128), par l'injection d'antigènes, extraits de la muqueuse intestinale.

En concevant l'autoimmunité comme une rupture possible de l'autotolérance, une mise au point sur la tolérance immunitaire s'avère nécessaire d'une part, et d'autre part, une description des maladies autoimmunes sera présentée. Une emphase particulière sera mise sur les aspects autoimmuns des IBD.



## I. TOLÉRANCE IMMUNITAIRE

La tolérance immunitaire peut être définie comme étant un état de non-réactivité spécifique du système immunitaire face à un antigène, requérant dans son développement un contact préalable avec lui. Ceci implique la tolérance naturelle (157) et la tolérance acquise (211,212).

Plusieurs états de tolérance existent, et peuvent s'y implanter par différents mécanismes (211). Ces états sont représentés par: (a) la tolérance aux antigènes autologues (tolérance naturelle) (221), (b) la tolérance induite pendant la vie néonatale (119), et (c) la tolérance induite sous certaines situations chez l'animal adulte (211,213). La tolérance naturelle implique surtout les lymphocytes T (130,132, 157); la tolérance acquise, par contre, ne paraît pas être le résultat de l'élimination des cellules immunologiquement compétentes T ou B (131,211). Quatre mécanismes peuvent y être impliqués: (1) neutralisation périphérique, (2) inhibition par des produits des lymphocytes T ou (3) des lymphocytes B, et (4) blocage des récepteurs lymphocytaires.

Ainsi, la tolérance immunitaire peut être acquise par un des deux types cellulaires T et/ou B (35,130,131), selon plusieurs mécanismes (85,86,190,211). Certains inhibent la réponse immune en paralysant ou en atténuant les cellules auto-réactives; d'autres agissent via les cellules suppressives ou les anticorps. Cet état de suppression des cellules autoréac-

tives, semble, selon Miller et al (120), plus compatible avec les mécanismes attendus dans l'induction de l'autotolérance.

Selon Burnet (27), la tolérance naturelle implique un mécanisme d'élimination des immunocytes foetaux immatures, lors d'un contact avec des autoantigènes spécifiques (théorie de la délétion clonale) (2). Cette hypothèse a sa démonstration expérimentale par le contact avec des antigènes à la période néonatale, contact qui induit un état de tolérance immunitaire spécifique (119,130,132). Ainsi, le contact avec de faibles doses de l'antigène (endogène ou exogène), est suffisant pour l'induction de la tolérance acquise (131,132). L'inactivation de la réponse immune induite par l'interaction entre des déterminants antigéniques et les récepteurs de surface lymphocytaire est un autre mécanisme majeur. Ce mécanisme implique la perte de réactivité chez une population spécifique de lymphocytes immunocompétents (131). D'autres études suggèrent que l'autotolérance peut résulter, en partie, d'une suppression active et continue exercée par les lymphocytes Ts (46,57,130, 136,214). L'élimination "in vitro" des Ts avec des anticorps anti-I-J, provoque une synthèse d'autoanticorps et une réaction lymphocytaire mixte autologue augmentée (46,57,141).

De plus, des anticorps seuls ou sous forme de complexes immuns, peuvent supprimer une réponse immune en cours. Ces mécanismes de suppression à médiation humorale, peuvent être considérés comme une autre forme d'induction de tolérance immunitaire. Ils incluent: (1) le masque de l'antigène par les

anticorps, bloquant la reconnaissance antigénique des récepteurs lymphocytaires, (2) la libération de facteurs suppresseurs par l'activation des Ts portant des récepteurs Fc et (3) la stimulation directe des cellules B avec des récepteurs Fc pour la sécrétion de facteurs suppresseurs solubles (190).

## II. RUPTURE DE L'AUTOTOLÉRANCE

La rupture de l'autotolérance est synonyme d'autoimmunité. Si l'autoimmunité implique l'incapacité de reconnaître les constituants autologues, il est pertinent de savoir quelle est la nature du processus ne pouvant pas distinguer entre les composantes du soi et celles du non-soi (164).

Une des premières propositions, fut celle expliquant la séquestration de certains autoantigènes dans l'organisme (157,190). De tels constituants sont masqués face au système immun, n'ayant pas eu l'opportunité d'établir une autotolérance. Des exemples incluent des protéines cornéennes (133), certaines protéines du cerveau (5), des spermatozoïdes (137), et la thyroglobuline (19, 172). Lorsque ces éléments traversent les barrières qui les séparent de la circulation, ils sont reconnus comme étant antigéniques, déclenchant par la suite, une réponse autoimmune.

La théorie soutenant que la tolérance est la conséquence de l'élimination ou l'inactivation des cellules T autoréactives, donne directement l'appui à l'idée que l'autoimmunité est

le produit du détournement des cellules T (4,210). La présentation d'une substance antigénique, comme par exemple une bactérie, couplée à un antigène autologue, permet une réponse des cellules T face à cette bactérie et, par conséquent, peut permettre aux cellules B de répondre face à l'antigène autologue (51). L'émulsion de l'autoantigène dans l'adjuvant complet de Freund (ACF), assure donc la capacité de stimuler les réponses à médiation cellulaire et humorale (28,30).

Un autre concept dans l'induction de réponses autoimmunes est le mimétisme moléculaire ou à l'aide d'antigènes ayant une réaction croisée avec l'antigène autologue. Certains exemples incluent les anticorps anti-idiotypes (221), et des bactéries possédant des épitopes communs avec les récepteurs de l'acétylcholine dans la myasthénie gravis (175), ainsi qu'avec des antigènes intestinaux dans la ECA (36,78,138). Afin de supporter ce concept, la pathologie doit être associée avec la présence de cet antigène dans l'organisme, et la réaction croisée entre l'antigène exogène et l'autoépitope doit être démontrée (89,134,138).

Selon certains auteurs, l'autoimmunité serait la conséquence d'une défaillance des mécanismes immunosuppresseurs au niveau de l'immunorégulation (42,136,157,178). Malheureusement, le rôle du circuit suppresseur antigène-spécifique est peu connu, dû à des techniques insuffisamment développées. Des essais sur les effets suppresseurs non-spécifiques montrent des évidences d'une dépression indiquant une

défectuosité de la contribution des Ts chez les patients atteints d'IBD (64,76,87), car les marqueurs des Ts sont absents. Le problème semble cependant plus complexe car le groupe de James (80) a analysé par cytofluométrie, le phénotype des lymphocytes T du sang périphérique (PBL) à l'aide d'anticorps monoclonaux (mAb) anti-Leu2 (marqueurs des Ts). Aucune différence n'a pu être identifiée dans la proportion des Ts chez les patients atteints de CD comparativement aux témoins. Toutefois, lorsqu'ils ont analysé les cellules tueuses naturelles (NK) à l'aide d'anti-HNK-2 / Leu-7, le pourcentage de cellules portant ces deux marqueurs Leu-2 et Leu-7 était augmenté. Dans une étude plus approfondie des PBL et des lymphocytes de la Lamina Propria (LPL), James et al (79), ont démontré qu'il existe une différence au niveau des phénotypes lymphocytaires entre les sujets malades et les sujets témoins. Au niveau des LPL, il y a une augmentation des cellules qui ont les marqueurs phénotypiques des lymphocytes auxiliaires/inducteurs et une diminution des lymphocytes suppresseurs/inducteurs et effecteurs. Egalement, le phénotype lié aux fonctions cytolytiques est réciproque, autant dans les LPL que les PBL.

Parallèlement à la présentation antigénique par les cellules accessoires (APC) impliquées dans l'induction et l'expression possible de réactions autoimmunes (157), nous retrouvons la question de l'expression des antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité (MHC) des tissus-cibles impliqués dans l'autoimmunité (14,179,196,197,198). Il est proposé que les antigènes du MHC de classe II (I-a chez la

souris et DR chez l'humain) soient impliqués dans la présentation d'autoantigènes (39) et qu'il existe des évidences assez nettes, que les tissus impliqués dans la réaction autoimmune expriment les antigènes de classe II du MHC (116). De plus, il y a un certain degré de prédisposition génétique pour certaines maladies autoimmunes (158,198), démontré dans l'induction d'encéphalite allergique expérimentale (EAE) chez la souris (16,17,74), chez le rat (67), ainsi qu'au niveau de la ECA chez la souris (128).

Certaines recherches tentent de définir le rôle des antigènes de classe II du MHC au niveau du système immunitaire. Elles impliquent l'étude du contrôle génétique sur la réponse immune, en utilisant des souches de souris consanguines montrant un état de susceptibilité lorsqu'immunisées avec un antigène donné (74,199,200). Les gènes liés à cet état ont été fréquemment localisés dans la région du MHC de classe II (42).

### III. AUTOIMMUNITÉ

#### 3.1 DÉFINITION

Le terme autoimmunité possède la connotation générale d'une réponse immune contre des autoépitopes qui, normalement, devraient être tolérés (108,157,213). L'exception existe pour certains autoantigènes isolés de la circulation, comme ceux des spermatozoïdes (118), tel que décrit par Ehrlich en 1901 avec l'expression "horror autotoxicus". Burnet proposa un rôle majeur au thymus dans la prévention de l'apparition de cellules

autoréactives. L'immunologie et la microbiologie ont apporté beaucoup au niveau de l'étude de ces désordres, entre autres, les postulats de Koch. Le caractère inviolable de l'autotolérance a permis à Burnet (26) de suggérer que la discrimination entre les autoépitopes et les antigènes étrangers soit une fonction primordiale du système immunitaire. Toutefois, l'état de tolérance aux antigènes autologues n'est pas absolu. Plusieurs chercheurs ont démontré un état d'autoréactivité face à certaines composantes du soi (108). Néanmoins, les maladies autoimmunes constituent encore un grand mystère qui mérite d'être approfondi. Depuis les deux dernières décénies, l'étude des maladies autoimmunes est surtout dirigée au niveau de l'homéostasie de l'organisme et de l'étiologie multifactorielle (172).

Plusieurs modèles expérimentaux de maladies autoimmunes ont été obtenus par le passé, dont la majorité sont des désordres spécifiques d'organe. Mentionnons l'orchite autoimmune expérimentale (AEO) induite par immunisation avec des protéines de spermatozoïdes (52,201,203); la thyroïdite autoimmune expérimentale (EAT), induite avec la thyroglobuline (172,217); l'encéphalomyélite autoimmune expérimentale (EAE), induite avec des protéines basiques de la myéline (16,52) et l'uvéorétinite autoimmune expérimentale (EAU), induite avec des antigènes rétinien (30). Dans tous ces modèles, les antigènes sont émulsifiés dans l'ACF.

La définition de maladies autoimmunes "spontanées" est

plus difficile à cerner. Certains désordres immunologiques sont reconnus comme étant des syndrômes cliniques autoimmuns (108). La thyroïdite autoimmune humaine (172), impliquant la présence d'autoanticorps contre la thyroglobuline et la présence de cellules inflammatoires au niveau de la glande; le lupus érythémateux systémique (SLE) (172), ayant une pathogénèse systémique et caractérisé par la présence d'autoanticorps dirigés contre des épitopes systémiques, pour ne mentionner que quelques-uns. L'inclusion des IBD dans cette catégorie reste encore à être acceptée. Toutefois, certaines études ont démontré un état d'autoréactivité face à des composantes autologues (89,100,173, 220). Par ailleurs, d'autres études démontrent l'existence d'autoanticorps chez ces patients (24,25,101).

Les immunologistes exigent non seulement que l'état auto-immun soit démontré par l'existence d'autoanticorps, l'induction des modèles expérimentaux ou par l'existence naturelle, mais également que la réponse soit impliquée dans la cause de la maladie. S'appuyant sur ces postulats, le rôle des autoanticorps dans les IBD n'est pas encore bien défini. Il est donc nécessaire de recourir à des modèles expérimentaux valables, qui pourront aider à la compréhension de leur étiologie.

### 3.2 LES AUTOANTICORPS

Plusieurs mécanismes proposés dans le développement d'autoanticorps ont été postulés. Ils sont inclus dans trois catégories. On retrouve dans la première catégorie, la stimu-



lation antigénique anormale pouvant s'effectuer par: a) une réaction croisée entre antigènes exogènes et autoantigènes (8,77,78,138); b) des autoantigènes modifiés (25,49); c) des tissus altérés (cellules transformées) (3); d) des tissus non-différenciés pendant l'ontogénie, car la tolérance s'acquiert pendant la période fœtale ou néonatale (119) et finalement, e) par des autoantigènes isolés du système immunitaire, par exemple ceux des spermatozoïdes (192). La deuxième catégorie de mécanismes inclut des cellules formant des autoanticorps provenant de clones mutants, par exemple, dans le syndrome de Sjogren (182). Un autre mécanisme possible, implique une fonction hyperréactive du gène Ir du MHC. La production d'autoanticorps, de même que la production d'autres anticorps, est probablement contrôlée génétiquement au niveau du MHC. La prédisposition à l'autoimmunité ayant été associée au MHC chez l'homme et chez certaines espèces d'animaux, est possiblement liée aux gènes Ir dans le MHC. Il a été suggéré, que les maladies d'origine autoimmunitaire, dépassent les bornes de Ir (198). Finalement, la troisième catégorie implique un mécanisme immunosuppresseur déficient, comme c'est le cas chez les patients atteints d'IBD (57,63,64,75,173). Des souris développant une uvéorétinite autoimmune expérimentale (EAU), montrent une atténuation des fonctions Ts (30). La production d'autoanticorps chez ces souris fut attribuée à ce mécanisme (46). Donc, la tolérance des cellules T face à certains autoantigènes est supprimée dans les maladies autoimmunes. La production d'autoanticorps pourrait ainsi débiter avec l'activation des cellules T par les autoantigènes.

La caractérisation des autoantigènes et autoanticorps permet de définir les diverses maladies autoimmunes. Ces deux composantes sont souvent localisées à l'aide de techniques d'immunofluorescence chez des patients atteints d'IBD (69,95), ainsi que dans des conditions expérimentales (82).

On peut classifier les maladies autoimmunes en deux groupes, selon l'étendue des organes et tissus atteints et de leur spécificité. Le premier groupe est constitué des maladies spécifiques d'organes, telles la thyroïdite autoimmune (AIT et AET) (18,156,172), la myasthénia gravis (MG) (54,68), l'encéphalomyélite autoimmune expérimentale (EAE) (105,210), l'orchite autoimmune expérimentale (OAE) (137,192), de même que l'uvéorétinite autoimmune expérimentale (EAU) (30,133). Cette spécificité d'organe fut également postulée au niveau des IBD et de leurs modèles expérimentaux (9,71,152,153,181). Le deuxième groupe est constitué des maladies autoimmunes non-spécifiques d'organes ou systémiques tel le SLE (172). Ces maladies doivent être analysées face à l'identité et à la distribution des autoépitopes et de leurs autoanticorps respectifs. L'identification, l'isolation et la purification de ces autoépitopes favoriseraient la compréhension de la maladie, et pourraient servir à l'immunodétection dans le diagnostic.

Finalement, le potentiel pathogénique ou cytopathogénique des autoanticorps et leur rôle dans la pathologie de maladies autoimmunes (198) serait un aspect important à considérer. Plusieurs études ont démontré l'effet pathogénique des auto-

anticorps. Deux exemples entre autres, soit la myasthénia gravis induite chez le rat à l'aide de mAb anti-récepteurs de l'acétylcholine (anti-AChR) (151), et la ECA induite par des transferts passifs d'autoanticorps anti-colon (70,103,163). Dans certaines maladies autoimmunes, par contre, les autoanticorps sont présents mais ne semblent pas avoir d'effets pathogéniques. Rabin et col. (145) décrivent une réponse non-pathogénique des autoanticorps produits chez le lapin.

Selon Perlmann et Holm (140), la lymphocytotoxicité dépendante d'anticorps (ADCC), est un phénomène où le dommage effectué aux cellules-cibles est médié par une combinaison des composantes cellulaires et humorales. Dans les IBD, la cytotoxicité des lymphocytes pour les cellules de la muqueuse du colon, implique un mécanisme immun médié par des autoanticorps cytophiles (167). Ainsi, les cellules sensibilisées par les IgG, sont susceptibles d'être détruites par les lymphocytes.

### 3.3 L'IMMUNITÉ A MÉDIATION CELLULAIRE

Des études récentes ont établi que les réponses immunes normales dépendent d'un équilibre entre cellules effectrices et régulatrices (29). Par ailleurs, le réseau immunorégulateur des cellules NK (natural Killer) et K ("antibody dependent cytotoxicity") (72), et le système monocyte-macrophage (124), sont moins définis mais portent un intérêt particulier. Plusieurs études sur ces mécanismes immunorégulateurs à l'aide de mAb ont été effectuées (79,80,150). Ces méthodes sont appli-

quées amplement à l'étude de la réponse immune normale et à l'étude des maladies humaines, ayant une pathogénèse impliquant des mécanismes immunitaires (60). Dans ce contexte, il a été démontré que certaines maladies autoimmunes sont associées à une dépression de la fonction des cellules Ts (64,79,177).

Les mécanismes de destruction tissulaire chez ces maladies sont peu connus. Pour certains cas cliniques ou expérimentaux, l'immunité à médiation cellulaire paraît jouer un rôle fondamental (157,208), tandis que pour d'autres, les autoanticorps sont impliqués directement (151). Dans ces cas, les titres des autoanticorps reflètent l'état de la pathologie.

Un autre mécanisme de destruction tissulaire anticorps-dépendant est celui médié par les cellules K, se liant aux récepteurs Fc des cellules sensibilisées avec des autoanticorps fixés à leur surface. Selon Shorter (168), il y a des lymphocytes cytotoxiques en circulation chez les patients atteints d'IBD, et ceux-ci peuvent détruire des cellules épithéliales intestinales "in vitro" (165,167,206,207). De plus, des lymphocytes normaux incubés avec le sérum autoimmun, montrent également cette cytotoxicité. Par contre, des lymphocytes cytotoxiques incubés avec un sérum autoimmun hétérologue perdent leur cytotoxicité. L'incubation avec un sérum autologue normal permet la récupération de l'activité cytotoxique (204).

Dans ce contexte, des anticorps (IgG ou IgM), des com-

plexes immuns et des anticorps couplés à des cellules cibles, sont capables d'induire une cytotoxicité face à des antigènes spécifiques, par l'interaction avec les récepteurs membranaires, par la partie Fc ou par le complément (41,140). Donc, la lyse cellulaire "in vitro" des cellules épithéliales causée par les cellules mononucléaires de patients atteints d'IBD, représente une cytotoxicité cellulaire médiée par les autoanticorps (ADCC) (73,176). Ces observations sont des arguments sérieux en faveur de mécanismes immunitaires à médiation cellulaire et humorale, jouant un rôle dans la pathogénèse des IBD.

Les cellules NK induisent une cytotoxicité à médiation cellulaire spontanée, ayant un rôle dans la surveillance immune et la destruction de cellules tumorales (160). Ces cellules agissent comme les cellules cytotoxiques, mais ne requièrent ni antigène, ni anticorps. Il est possible, comme pour les cellules K, que celles-ci soient affectées par certaines influences régulatrices pouvant être altérées dans l'IBD (72,80). Mowat et al (121,122), ont conclu que les cellules NK sont des composantes essentielles à la réaction d'hypersensibilité retardée, responsable de la destruction tissulaire dans des réactions greffons-versus-hôte ayant comme cible l'intestin.

Plusieurs études de transformation blastique (TB) sur les cellules T, démontrent chez la EAU (30), la EAE (15), la AIT et la AET (112,136,156,200), la EAE (186) de même que chez les patients atteints d'IBD (205) et chez des modèles de ECA (71, 126), que ces cellules T sont sensibilisées face à des antigène-

nes particuliers vis-à-vis lesquels une réponse humorale a eu lieu. Il n'a pas non plus été démontré, que pour ce dernier, ces cellules T sont cytotoxiques, mais elles peuvent avoir un rôle dans l'initiation du dommage tissulaire.

Toutefois, la stimulation non-spécifique "in vitro" des lymphocytes circulants d'IBD, avec la phytohémagglutinine (PHA) et la concanavaline A (Con A), est diminuée dans certaines études (159,208) et normale dans d'autres (1). La réponse mitogénique diminuée des cellules T est possiblement affectée par un déséquilibre du ratio Th/Ts. Cette hypothèse est supportée par des études mettant en évidence une réduction de l'induction de l'activité des Ts, à l'aide de la Con A (64,76, 87,109). L'augmentation du ratio est attribuable à une déplétion sélective des cellules Ts (164). Une diminution des Ts permet aux Th de favoriser une réaction inflammatoire à l'aide de lymphokines, et la régulation de la synthèse des anticorps est affectée par la chute des Ts (42).

L'implication des macrophages dans les lésions tissulaires de nature autoimmunitaire doit être mentionnée car ces derniers peuvent être activés par des lymphokines ou armées d'anticorps cytophiles (167). Nelson et Boyden (125) ont démontré la présence d'anticorps cytophiles attachés aux macrophages ou aux lymphocytes, leur conférant ainsi la capacité de réagir avec l'antigène. Le rôle potentiel des macrophages dans les IBD se rapporte principalement aux granulômes, qui représentent un caractère important de la réponse inflammatoire (66,174).

### 3.4 MALADIES AUTOIMMUNES

Les maladies autoimmunes peuvent être classifiées en deux grandes catégories: 1) les maladies autoimmunes systémiques; 2) les maladies autoimmunes spécifiques d'organe (154,172,190). Les premières ont comme cible, plusieurs organes ou tissus de l'organisme affecté. Les maladies autoimmunes spécifiques d'organe se caractérisent par l'implication d'autoantigènes qui se localisent dans un seul organe. La thyroïdite autoimmune humaine est un exemple classique de maladie autoimmune spécifique d'organe (18). La plupart des caractéristiques de cette maladie peuvent être induites expérimentalement par des immunisations avec de la thyroglobuline chez des animaux de laboratoire. De plus, on observe des thyroïdites spontannées chez des animaux génétiquement susceptibles au développement de la maladie (19,172). Toutefois, il existe un certain nombre de maladies qu'on hésite à inclure dans la catégorie des désordres autoimmuns, bien qu'elles montrent des traits autoimmuns comme par exemple la présence d'autoanticorps.

Selon Mackay et al (108), la caractérisation, l'isolation et la localisation des autoépitopes spécifiques, liés à des réactions avec les autoanticorps, aident à comprendre et à définir certaines maladies appartenant à la catégorie des maladies autoimmunes et par conséquent, à les classifier dans l'une ou l'autre des catégories citées plus haut. Si la réponse autoimmune est pathogénique, les autoépitopes doivent être accessibles aux autoanticorps et aux cellules du système immunitaire.

### 3.4.1 MALADIES AUTOIMMUNES SPÉCIFIQUES D'ORGANE

Le meilleur exemple de maladie autoimmune spécifique d'organe, pour lequel les autoépitopes ont été bien identifiés, est la thyroïdite autoimmune, pouvant être induite expérimentalement (EAT) par des immunisations de thyroglobuline avec de l'ACF (18). Il s'agit d'une maladie chronique, affectant la glande thyroïde, caractérisée par une réponse immune à médiation humorale et cellulaire (156). Cette réaction immune est médiée par des antigènes spécifiques d'organes (170), induisant une infiltration inflammatoire et une destruction tissulaire au niveau de la glande (18). Les autoantigènes spécifiques de la thyroïde sont présents en assez grand nombre. Ces autoépitopes incluent la thyroglobuline contenant huit (8) déterminants antigéniques (155), le second antigène colloïdal, le cytoplasme des cellules épithéliales des follicules, représentant la thyroglobuline nouvellement synthétisée et la surface membranaire de ces cellules (11).

Des études au niveau de la thyroïdite autoimmune expérimentale (EAT) pouvant être induite chez des souris histocompatibles, démontrent qu'il y a des variations importantes de la réponse immune de différentes souches de souris (200). Ces différences existent à l'intérieur de l'une ou l'autre des catégories; bons ou mauvais répondeurs (199). La susceptibilité est contrôlée par deux gènes inclus dans le MHC. Le gène Ir, localisé dans la région I-A (classe II), détermine l'importance de la production d'anticorps et des lésions pathologi-



ques. Les autres, localisés à la fin des gènes K et D (classe I), agissent sur la réponse effectrice et contrôlent la sévérité des dommages tissulaires (18).

Plusieurs exemples de maladies autoimmunes spécifiques d'organe peuvent être signalés, comme par exemple, les maladies affectant les récepteurs, incluant la myasthénia gravis (68,151). Les autoépitopes sont localisés dans la région immungénétique principale de la chaîne alpha du AChR (194). Dans le diabète mélitus (insulino-résistant), les autoépitopes sont présents sur les sous unités alpha et beta du récepteur de l'insuline (68). Pour l'encéphalomyélite autoimmune expérimentale, ces derniers sont présents au niveau d'une protéine basique de la myéline (15,148,210), tandis que dans l'orchite autoimmune expérimentale, les autoépitopes sont localisés au niveau du spermatozoïde (137,192). En cours de caractérisation, les maladies inflammatoires de l'intestin (UC et CD) semblent posséder des autoépitopes spécifiques d'organe (181). Ces autoantigènes semblent être localisés au niveau du cytoplasme des cellules de l'épithélium intestinal (220).

### 3.4.2 MALADIES AUTOIMMUNES SYSTÉMIQUES

Le lupus érythémateux systémique (SLE) est une maladie autoimmune systémique impliquant une grande variété d'organes et de tissus (47). Néanmoins, deux systèmes sont principalement affectés: les systèmes urinaire et nerveux (44,114).

Les anticorps anti-noyau (ANA) semblent représenter le degré de pathogénèse du SLE. Selon Tan et al (184), les ANA spécifiques incluent les anti-DNA et les anti-Sm et sont reliés à l'expression de la pathologie chez l'humain et chez les modèles expérimentaux. Selon Ferrell et Tan (47), les autoanticorps présents dans le SLE sont dirigés contre plusieurs autoépitopes. Ils incluent le noyau, le cytoplasme, les facteurs de coagulation, les érythrocytes, les lymphocytes, les plaquettes sanguines et autres, spécifiques à certains organes.

Les autoépitopes immunoréactifs avec les ANA présents dans le sérum de patients, sont localisés au niveau de l'ADN, des histones et des ribonucléoprotéines (108). Il existe trois différentes souches de souris exprimant plusieurs des caractéristiques du SLE humain (47), entre autres les souris NZB/W qui ont des ANA associés à une glomérulonéphrite. Ces ANA sont dirigés contre l'ADN à double et simple brin, contre les nucléoprotéines, l'ARN et l'ARN<sub>t</sub> (183). Certaines de ces caractéristiques sont présentes aussi chez les souris MRL et BXSB.

#### IV. MODÈLES EXPÉRIMENTAUX DES IBD

L'étiologie de la UC et de la CD est encore inconnue (93). On peut donc s'appuyer sur des modèles expérimentaux, reproductibles, qui présentent plusieurs des caractéristiques des IBD humaines (100,117). Dans ce sens, il y a deux groupes majeurs: (1) ceux impliquant l'administration d'agents exogènes et (2)

ceux altérant l'homéostasie de l'animal par des modifications des mécanismes systémiques (117). Cependant, certaines tentatives expérimentales sont plus prometteuses (191). Des travaux plus poussés sont nécessaires pour l'identification d'agents ou de mécanismes impliqués dans l'étiologie des IBD.

Les travaux de notre laboratoire ont montré que l'on pouvait induire des entérocolites autoimmunes (ECA) chez le cobaye et la souris par immunisation avec un antigène extrait de la muqueuse intestinale (PI: protéines intestinales) (126, 128, 129). L'objectif de la recherche présentée ici est de caractériser l'antigène extrait de la muqueuse de l'intestin grêle du cobaye et de la souris. Des études sur les déterminants antigéniques pouvant être spécifiquement impliqués, ont été effectuées par SDS-PAGE, ELISA et immunoblotting à l'aide d'anticorps hétérologues, isologues et autologues. Egalement, des allo- et autoimmunisations chez des souris histocompatibles, ont permis d'initier une analyse sérologique, immunochimique et génétique au niveau de la susceptibilité au développement de ECA.

## **MATÉRIELS ET MÉTHODES**

## I. ANIMAUX UTILISÉS

L'isolation de l'antigène de la muqueuse de l'intestin grêle (Protéine intestinale PI) est effectuée à partir de deux espèces animales, soit: Cobayes Hartley mâles ayant un poids de 500-700 grammes (Canadian Breeding, St-Constant, Qué.) et souris CD1 mâles (suisse) et BALB/c consanguines mâles (Charles River, St-Constant, Qué.) âgées de plus de 6 mois, ayant un poids de plus de 30 grammes. Des lapins NZW (New Zealand Withe) adultes mâles, ont été utilisés pour l'obtention des hétéroantisérums.

## II. ISOLATION ET EXTRACTION DE L'ANTIGÈNE PI

### 2.1 OBTENTION DES GRATTAGES (SCRAPINGS)

L'isolation de PI s'effectue à partir des grattages de la muqueuse de l'intestin grêle (du duodénum jusqu'à la partie distale de l'iléon) de cobayes et de souris, selon des modifications de la méthode décrite par Forstner et al (50). Habituellement, 2 cobayes ou 20 souris sont traités à la fois.

Les animaux sont sacrifiés à l'éther et saignés à blanc. L'intestin grêle est prélevé et lavé avec 0.9% NaCl froid. La lumière intestinale est ensuite ouverte et des segments de 6 cm environ sont obtenus. Ils sont maintenus hydratés à l'aide de papier buvard imbibé dans la solution physiologique. Pour l'obtention des grattages, on déplace une lame histologique

le long du segment, placée à un angle de 45°, soumise à une pression maintenue. Le poids total du grattage obtenu est d'environ 13 g pour 2 cobayes ou 20 souris.

## 2.2 PRÉPARATION DES EXTRAITS BRUTS

Le grattage est homogénéisé dans un malaxeur (Waring Blendor, modèle 700S) pendant une minute avec EDTA 5 mM (100 ml/gramme de grattage). L'homogénat est ensuite centrifugé pendant 30 minutes à 4°C, à 36,000 g dans une centrifugeuse (Sorval superspeed RC2-B) utilisant une tête de modèle SS-34. Après centrifugation, les surnageants sont dialysés pendant 48 heures dans l'eau distillée à 4°C. L'eau distillée est changée à trois reprises. Le dialysat est ensuite congelé sous azote liquide et lyophilisé (Lyophilisateur Labconco, modèle Freeze Dry-5).

## 2.3 CHROMATOGRAPHIE DES EXTRAITS BRUTS

La moitié de l'extrait brut obtenu (entre 0.5 - 1.0 gramme pour 2 cobayes ou 20 souris) est resuspendue dans un volume de 12 ml avec de l'eau distillée. Cette suspension est centrifugée pendant 30 minutes à 36,000 g à 4°C. Le surnageant est recueilli et 1 ml est conservé pour dosages ultérieurs. Le reste de ce dernier est déposé sur une colonne de Séphacryl S-200 Superfine de 2.6 x 100 cm (Pharmacia, Uppsala), équilibrée avec le tampon d'élution. Après l'introduction de l'échantillon à l'aide d'une pompe péristaltique P-3 (Pharma-

cia, Uppsala), le débit est fixé à 65 ml/heure, en utilisant comme éluant, un tampon Tris-HCl NaCl pH 8.0 (0.1 M Tris, 0.2 M NaCl). Des fractions de 5 ml sont recueillies à l'aide d'un collecteur de fractions LKB 7,000 Ultrorac et d'une pompe péristaltique P-3 (LKB, Bromma, Suède), programmé à 60 gouttes/tube, pour un total de 200 tubes. Les fractions sont lues à 280 nm, à l'aide d'un détecteur (Modèle 111B, Gilson) et le profil chromatographique est tracé par une imprimante (Zipp & Zonen BD40) réglée à 0.5 mm/minute.

Une fois le profil chromatographique obtenu, des "pools" de protéines sont préparés. Le pic suivant le volume exclu (prédéterminé à l'aide de Bleu Dextran), est nommé PI et utilisé comme immunogène tout au long de notre étude. Ce "pool" de protéines est dialysé pendant 48 heures à 4°C contre de l'eau distillée, qui est remplacée à trois reprises, puis congelé sous azote liquide et finalement lyophilisé. La concentration protéinique a été dosée par la méthode de Lowry et al. (107).

### III. ÉLECTROPHORÈSE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE-SDS (SDS-PAGE)

L'électrophorèse des protéines s'est effectuée selon une modification de la technique décrite par Sidman (171), à l'aide d'un appareil électrophorétique vertical SE-500 (Hoeffer Scientific Instruments, CA., USA), relié à une source de pouvoir (Modèle 200/2.0, BioRad, Richmond, CA., USA). Deux types de gels de polyacrylamide sont utilisés dans ces expériences. Un gel de polyacrylamide (15%) et un gel en gradient continu

(5-15%). Ce dernier est coulé à l'aide de deux réservoirs communiquants et d'une pompe péristaltique P-3, ayant un débit de 3 ml/minute.

Le gel ayant une épaisseur de 1.5 mm, est polymérisé dans un bain-marie à 37°C pendant une heure. La polymérisation terminée, le gel est lavé à quelques reprises avec de l'eau distillée, puis séché à l'aide d'un papier buvard pour éliminer l'excès d'eau à la surface du gel. Le gel d'initiation (3% d'acrylamide), permettant l'entassement des protéines en une bande fine au début de l'électrophorèse, est coulé (dans le cas des deux types de gel) à la mince surface supérieure libre du gel de polyacrylamide, à l'aide d'une seringue jetable (3 cc), puis polymérisé à 37°C en chambre humide pendant une heure.

Le gel d'initiation est finalement lavé trois à quatre fois avec du tampon de migration (Tris 0.025 M, pH 8.3) pour éliminer le gel non-polymérisé. Les échantillons de PI, ainsi que des lyophilisats d'extraits salins de foie, de rein et de testicule de cobaye ou de souris, à des concentrations protéiques variées, sont resuspendus dans du tampon Laemli (Tris 0.25 M - SDS, pH 6.8). Ces échantillons sont ensuite dénaturés par ébullition pendant 10 minutes dans un bain-marie, puis utilisés au même moment ou conservés, si nécessaire, à -80°C.

Des études préalables nous ont permis de déterminer les concentrations optimales des protéines à analyser. Ces concentrations sont de 50 µgN pour les échantillons de PI et d'ex-



traits salins de cobaye, et de 75 µgN pour ceux de souris. Les échantillons sont déposés dans les puits (maximum 50 µl) à l'aide d'une microseringue de 50 µl (Hamilton). Les deux réservoirs de l'appareil électrophorétique vertical SE-500 sont remplis de tampon de migration (Tris 0.025 M, pH 8.3). L'électrophorèse s'effectue dans un premier temps à 25 mA/gel. Lorsque la bande fine de protéines termine son passage à travers le gel d'initiation, la puissance est augmentée à 30 mA/gel et finalement, 10 minutes avant la fin de la migration, à 50 mA/gel, permettant aux bandes polypeptidiques de s'entasser.

La séparation des bandes protéiques ainsi terminée, les gels sont colorés pendant une nuit sous agitation à la température ambiante, dans une solution de 0.1% Bleu Coomassie dans un mélange de méthanol, acide acétique, eau (5:1:4 v/v). La coloration de fond est par la suite éliminée avec une solution décolorante constituée d'éthanol, d'acide acétique et d'eau (2.5:1:6.5 v/v). Les gels peuvent être conservés dans une solution d'acide acétique 7% - Glycérol 1%. Les poids moléculaires des bandes polypeptidiques ainsi séparées, sont estimés par comparaison à la migration simultanée de standards de poids moléculaires (Rainbow Protein Molecular Weight Markers, Amersham, UK) ayant des poids moléculaires variant entre 3.4 et 46 kilodalton (Kd).

#### IV. ANTISÉRUMS ANTI-PI (HÉTÉROLOGUES, ISO- et AUTOLOGUES)

##### 4.1 SÉRUMS ANTI-PI HÉTÉROLOGUES

Des lapins NZW (New Zealand White) adultes mâles, ont été utilisés pour l'obtention de sérums hétérologues anti-PI de cobaye et de souris. Deux lapins ont été immunisés avec cinq doses de 500 µgN de PI de cobaye émulsifié dans l'ACF (Difco Laboratories, Détroit, Michigan) à 14 jours d'intervalle. Deux autres lapins ont été immunisés selon une même cédule, mais utilisant le PI de souris comme immunogène. Des saignées sont effectuées quelques jours après les immunisations et des tests de détection immunoenzymatique (ELISA) permettent d'établir les titres des sérums anti-PI. Lorsque le titre atteint un plateau, habituellement entre 65 et 90 jours après la première dose d'immunisation, les animaux sont anesthésiés avec une injection intra-péritonéale (I.P.) de nembutal (Abbott, Montréal, Qué.), puis saignés à blanc. Les sérums sont séparés après coagulation par centrifugation (7000 g / 10 minutes), inactivés pendant 30 minutes à 56°C, puis conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

##### 4.2 OBTENTION DE LA FRACTION GLOBULINIQUE

La fraction globulinique (F.G.) a été obtenue par filtration à travers une colonne d'immunoabsorption, composée de 10 ml de sépharose 6MB conjugué à la Protéine-A (Pharmacia, Uppsala) dans une colonne de 2 cm x 9 cm (seringue de 25 cc)

(62). Un volume de 5 ml est ajouté à cette colonne. Les immunoglobulines se lient de façon non-covalente par leur segment Fc à la protéine-A de Staphylococcus aureus immobilisé sur les billes de Sépharose. Le reste du contenu sérique ne contenant pas d'immunoglobulines est éliminé par lavage dans le PBS. Par la suite, les immunoglobulines sont éluées en utilisant un acide faible (0.58% v/v acide acétique dans 0.15 M NaCl). La fraction globulinique est dialysée, lyophilisée, puis resuspendue dans 10 ml de PBS.

Les sérums hétérologues et leurs fractions globuliniques, ont été analysés par ELISA avant et après des absorptions successives avec des extraits salins de foie, de rein, de testicule et également de PI de cobaye et de souris. Ces absorptions sont effectuées en utilisant 1 ml de sérum ou de fraction globulinique, incubé avec 10 mg de lyophilisat dans un bain marie à 37°C pendant une heure et à 4°C pendant la nuit. Après centrifugation à 7,000 g pendant 10 minutes, les surnageants sont séparés et conservés à -20°C ou soumis à de nouvelles absorptions. Le critère retenu a été la persistance ou la disparition des réactions croisées entre le PI et les extraits salins des organes ci-dessus mentionnés ou, dans le cas des absorptions avec les PI homologues, la négativité des réactions sérologiques.

#### 4.3 SÉRUMS ANTI-PI ISOLOGUES

Dans un premier temps, cinq cobayes ont été immunisés avec 3 doses de 5 mgN de PI de cobaye Hartley, dissout dans 250  $\mu$ l de PBS et émulsifié dans un volume égal d'ACF. Cinq cents  $\mu$ l de l'émulsion sont injectés par voie sous cutanée à chaque animal. Les animaux sont nourris selon une diète normale de laboratoire. Les doses sont administrées à 30 jours d'intervalle, et les animaux sont sacrifiés au jour 90. Les témoins sont injectés avec des doses et des volumes égaux de l'émulsion ACF/PBS, ou PBS seul.

Dans un deuxième temps, deux lignées de souris consanguines ont été utilisées, soit des souris BALB/c (2/H)<sup>d</sup> et C57bl/6 (2/H)<sup>b</sup> mâles âgées d'environ 30 jours (15 g) (Charles River, St-Constant, Qué.). Elles sont nourries selon une diète normale de laboratoire. Les animaux ont été divisés en six groupes.

Le premier groupe constitué de trois souris BALB/c et trois souris C57bl/6, a été immunisé avec une seule dose de 250  $\mu$ gN de PI de souris CD1 dissout dans 100  $\mu$ l de PBS et émulsifié dans un volume égal d'ACF. Le deuxième et troisième groupes, composés d'un nombre égal d'animaux que le premier groupe, ont été immunisés avec 500  $\mu$ gN et 1000  $\mu$ gN respectivement de PI de souris CD1, selon les mêmes conditions que le premier groupe. Deux cents  $\mu$ l des émulsions ont été injectées par voie sous cutanée (S.C.) au niveau du cou au jour 0. Les animaux ont été sacrifiés au jour 30 (18 animaux).

Les animaux appartenant aux groupes quatre, cinq et six, ont été immunisés à 30 jours d'intervalle avec deux doses de PI de souris CD1 émulsifié dans ACF, à la concentration de 250 µgN, 500 µgN et 1000 µgN respectivement. Treize souris BALB/c ont reçu 1000 µgN, 3 ont reçu 500 µgN et 3 autres ont reçu 250 µgN de PI de souris (19 animaux), tandis que pour les souris C57bl/6, 3 souris ont été utilisées pour chacune des doses (9 animaux). Elles ont été sacrifiées au jour 60.

Pour chacun des groupes expérimentaux, trois animaux témoins immunisés avec l'ACF seul, émulsifié dans PBS et trois injectés avec PBS seul, y ont été inclus. Les animaux ayant été injectés avec ACF seul, ont reçu une quantité équivalente de m. Tuberculosis et le même nombre d'injections que les groupes expérimentaux, de même que ceux ayant reçu uniquement du PBS.

Au moment du sacrifice, les animaux sont saignés. Les sérums obtenus sont séparés après coagulation par centrifugation (7000 g/10 minutes), inactivés pendant 30 minutes à 56°C, puis conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

#### 4.4 SÉRUMS ANTI-PI AUTOLOGUES

Dans une autre série d'expériences, des souris BALB/c mâles, pesant entre 15-20 grammes au début de l'immunisation, sont utilisées. Cinq animaux sont injectés avec deux doses de PI de souris BALB/c à une concentration de 1000 µgN, dissout

dans 100 µl de PBS et émulsifié dans un volume égal d'ACF. Les doses sont données à 30 jours d'intervalle et les souris sont sacrifiées au jour 60. De plus, 3 animaux immunisés avec ACF seul, émulsifié dans PBS et 2 autres injectés avec PBS seul, sont utilisés comme souris témoins.

#### V. ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay).

Cette technique à été modifiée à partir de travaux originaux de Voller et al (180,202). L'immunogène (PI de cobaye ou de souris) ou des extraits salins d'organes (Foie, rein ou testicules de cobaye ou de souris) sont fixés sur des plaques de 96 puits en PVC à fond rond (Titertek, Flow laboratories Inc., McLean, VA., USA) à des concentrations variant entre 35 µgN/ml et 4.375 µgN/ml (doubles dilutions). L'échantillon est dilué dans du NaHCO<sub>3</sub> 0.1 M, pH 9.0. Cinquante µl de chacune des dilutions sont déposés dans les puits, et fixés pendant la nuit à 4°C en chambre humide. Le lendemain, l'antigène est éliminé en secouant vigoureusement la plaque et les puits sont saturés à l'aide de PBS contenant 1.0% BSA (Sigma, St-Louis, MO., USA) pendant une heure à 37°C. Une fois saturées, les plaques sont lavées à quatre reprises à l'aide d'une solution de lavage (PBS + 0.05% BSA + 0.05% tween 20). Les sérums sont dilués dans des tubes sérologiques, en utilisant comme diluant la solution de lavage décrite ci-dessus. Les dilutions utilisées pour chacun des antisérums sont de 1/5000 pour l'anti-PI de cobaye hétérologue et 1/1000 pour l'anti-PI de souris, absorbés ou non, ainsi que de leur fraction globulinique respective. Et la

dilution utilisée pour les antisérums anti-PI isologues, est de 1/100. Les dilutions des sérums pré-immuns sont toujours réciproques de celles utilisées ci-dessus. Cinquante  $\mu$ l de chacune des dilutions sont ajoutés aux puits respectifs. Les plaques sont incubées sous agitation pendant une heure à la température de la pièce. Les puits sont par la suite vidés, puis lavés à l'aide du tampon de lavage à quatre reprises. Suite aux lavages, 50  $\mu$ l d'antisérum de chèvre anti-immunoglobulines de l'espèce animale d'où provient le sérum, Biolinylé (BRL Gaithersburg, MD., USA), dilué 1:1000 dans du PBS 1% BSA, sont ajoutés dans l'ensemble des puits et incubés sous agitation pendant une heure à la température ambiante. Par la suite, les plaques sont lavées à quatre reprises avec le tampon de lavage, puis 50  $\mu$ l de Streptavidine conjuguée à la Peroxidase (BRL 9505A2, Gaithersburg, MD., USA) diluée 1:1000 dans du PBS 1% BSA, sont ajoutés dans l'ensemble des puits et incubés sous agitation pendant 30 minutes à la température ambiante. Les plaques sont lavées à six reprises avec le tampon de lavage, puis les complexes formés sont révélés par l'ajout de 100  $\mu$ l de tampon citrate 0.03 M; phosphate 0.05 M, pH 4.6 contenant 0.02%  $H_2O_2$  et 1.0 mg d'Orthophénylènediamine (OPD, Sigma, St-Louis, MO., USA)/ml de tampon citrate-phosphate pH 4.6. Les plaques sont incubées pendant 15 - 30 minutes à la température de la pièce, dans l'obscurité. La réaction est arrêtée par l'addition de 25  $\mu$ l/puit de  $H_2SO_4$  4.0 N. Les plaques sont lues à l'aide d'un spectrophotomètre (Titertek Multiskan, Flow laboratories Inc., McLean, VA., USA) à 450 nm. Le titre obtenu correspond à l'inverse de la plus haute dilution donnant des

valeurs positives. Les analyses statistiques entre les groupes de souris sont effectuées selon le test t de Student ( t indépendant ) afin de comparer la réponse immune, tel que déterminée par ELISA, entre deux groupe indépendant qui possèdent un groupe témoin commun. De plus, l'utilisation de la méthode de Tukey-Kramer a été utilisée pour des comparaisons multiples pour des valeurs de "n" différentes.

Le témoin utilisé est le sérum normal de l'espèce animale d'où provient le sérum étudié. Avant la lecture de la plaque, le blanc est effectué à l'aide de tous les réactifs décrits ci-dessus, en absence d'antigène et d'anticorps. De plus, pour chacune des dilutions d'antigène ou d'anticorps, un témoin négatif est effectué avec un puits incubé uniquement en présence d'antigène ou d'anticorps respectivement (schéma 1).



**SCHEMA 1**

Exemple de protocole pour ELISA

	1	2	3	4	5	6
A	blanc	Ag a Ac a	Ag b Ac a	Ag c Ac a	Ag d Ac a	Ac a
B	blanc	Ag a Ac b	Ag b Ac b	Ag c Ac b	Ag d Ac b	Ac b
C	blanc	Ag a Ac c	Ag b Ac c	Ag c Ac c	Ag d Ac c	Ac c
D	blanc	Ag a Ac d	Ag b Ac d	Ag c Ac d	Ag d Ac d	Ac d
E	blanc	Ag a Ac e	Ag b Ac e	Ag c Ac e	Ag d Ac e	Ac e
F	blanc	Ag a Ac f	Ag b Ac f	Ag c Ac f	Ag d Ac f	Ac f
G	blanc	Ag a	Ag b	Ag c	Ag d	
H	blanc	Ag a	Ag b	Ag c	Ag d	

Ag: Antigènes a-b-c-d représentent les différentes concentrations.

Ac: Anticorps a à f représentent les différentes dilutions.

## VI. ANALYSE PAR IMMUNOTRANSFERT

L'analyse est effectuée par modification et standardisation de certaines techniques décrites antérieurement (13,58,59, 193), afin d'obtenir une meilleure sensibilité et une plus grande résolution des bandes immunoréactives. Dans une première étape, et selon une méthode décrite en section III de ce chapitre, les antigènes PI de cobaye et de souris, de même que des extraits salins d'organes (foie et rein) de cobaye et de souris, sont séparés par électrophorèse SDS-PAGE sur un gradient de polyacrylamide (5-15%). Les concentrations protéiques pour les extraits de cobaye, sont de 45 µgN/puit ou de 900 µgN lorsque l'on ajoute l'échantillon sur l'ensemble du gel, tandis que pour les extraits de souris, 75 µgN/puits ou 1650 µgN sont respectivement utilisées.

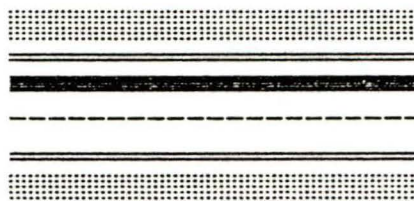
Une fois l'électrophorèse terminée, les bandes polypeptidiques sont transférées par électrotransfert sur membrane de nitrocellulose 15 x 9.2 cm, ayant une porosité de 0.45 µm (BA85, Schleicher & Schuell, Inc., Keene, NH., USA). Le montage ("sandwitch") est constitué dans l'ordre d'une éponge (fiber pads, BioRad), d'un papier filtre (Wattman #2), du gel électrophorétique, de la membrane de nitrocellulose, d'un papier filtre et d'une éponge. Le courant électrique s'effectue de la cathode (-) vers l'anode (+), ainsi le gel doit être situé du côté de la cathode, permettant le transfert des bandes polypeptidiques sur la membrane de nitrocellulose située du côté de l'anode (schéma 2).

**SCHÉMA 2**

# Montage de l'électrotransfert

Éponge  
Wattman  
Gel  
Nitrocellulose  
Wattman  
Éponge

cathode (-)



anode (+)

L'électrotransfert s'effectue dans une chambre de transfert (Transblot cell, BioRad, Richmond, CA., USA), remplie d'un tampon Tris 0.025 M; Glycine 0.15 M contenant 20% de méthanol et 0.6% de SDS. Une source de pouvoir (Modèle 200/2.0, BioRad, Richmond, CA., USA) est branchée aux bornes de la chambre de transfert contenant une colonne de refroidissement. L'électrotransfert s'effectue à 100 Volts pendant 2 heures sous agitation à l'aide d'un agitateur magnétique. Une fois le transfert des bandes polypeptidiques terminé, la membrane de nitrocellulose est coupée en plusieurs petites bandelettes (0.5 cm de largeur). Ces dernières sont ensuite saturées dans une solution de TBS (Tris 10 mM; 0.15 M NaCl, pH 7.4) contenant 3.0% BSA (Sigma, St-Louis, MO., USA) par incubation de 2 heures à 37°C sous agitation. Ensuite, les bandes sont lavées à la température de la pièce, à l'aide de TBS contenant 0.05% tween 20 (Sigma, St-Louis, MO., USA) pendant 10 minutes à trois reprises sous agitation .

Les bandes de nitrocellulose sont déposées dans les puits individuels d'un plateau à incubation (Incubation Tray #25, BioRad, Richmond, CA., USA). Les anticorps sont dilués à des dilutions appropriées dans du TBS - 0.05 % tween 20 - 0.05% BSA, puis 10-15 ml de chacune des dilutions sont incubés avec des bandes respectives pendant 3 heures sous agitation, à la température ambiante. Les différentes dilutions utilisées pour chacun des antisérums varient selon leur origine. Les antisérums hétérologues anti-PI de cobaye sont dilués à 1/500, 1/100 et 1/50 selon qu'ils soient entiers, absorbés ou purifiés res-

pectivement. Les antisérums hétérologues anti-PI de souris sont dilués comme ci-dessus, à des dilutions de 1/700, 1/500 et 1/50 respectivement. Les sérums anti-PI de cobaye isologues sont dilués à 1/10 et les sérums anti-PI de souris isologues absorbés ou non, de même que les sérums autologues, sont dilués à 1/20. De plus, les sérums témoins sont dilués respectivement aux dilutions des antisérums utilisés. Les bandes sont ensuite lavées avec du PBS contenant 0.05% tween 20 à trois reprises pendant 10 minutes à la température ambiante, sous agitation. Les bandes lavées, sont incubées avec l'antisérum respectif chèvre anti-IgG et IgM de souris conjugué à la peroxidase (Boehringer), lapin anti-IgG de cobaye conjugué à la peroxidase (Miles-Yeda LTD., Rehovot, Israel) ou chèvre anti-IgG (H+L) de lapin conjugué à la peroxidase (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA., USA). L'antisérum est dilué 1:1000 dans du PBS - 0.05% tween 20 - 0.5% BSA et incubé pendant une heure à 37°C sous agitation. Les bandes sont lavées pendant 10 minutes à deux reprises dans du PBS - 0.05% tween 20, sous agitation à la température ambiante et à deux autres reprises dans les mêmes conditions, avec PBS seul. Finalement, la révélation des bandes polypeptidiques immunoréactives s'effectue à l'aide d'un substrat pré-filtré constitué de 0.05% de 4-Chloro-1-naphthol 97% (Aldrich Chemical Company Inc., Milwaukee, Wisconsin, USA), 0.05% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%, dans du PBS. Les différentes bandes de nitrocellulose sont incubées avec 15 ml de substrat pendant 10 minutes à la température ambiante en chambre noire, puis une fois les bandes révélées, la réaction est arrêtée par l'ajout d'eau distillée.

## RÉSULTATS



## I. CHROMATOGRAPHIE DES EXTRAITS BRUTS.

Le profil chromatographique résultant de la chromatographie des extraits bruts sur Séphacryl S-200 superfine, est composé de plusieurs pics majeurs chez la souris et chez le cobaye. Ces pics majeurs sont au nombre de cinq (5) pour l'extrait de souris et de six (6) pour l'extrait de cobaye (Figures 1 et 2). Pour l'extrait de cobaye, le pic suivant le volume exclu (PI cobaye), atteint une densité optique (D.O.) à 280 nm, se situant à environ 0.8, tandis que pour PI de souris, le pic atteint une D.O. se situant environ à 0.6. Le profil chromatographique décrit ci-dessus, est similaire d'une expérience à l'autre et les protéines qui les constituent ont un poids moléculaire se situant en dessous de 250 Kilodalton (Kd). A travers tous nos travaux, nous avons choisi le pic majeur sortant à la suite du volume exclu (Pool 3) comme immunogène et nous l'identifions comme "antigène PI".

## II. ÉLECTROPHORÈSE SDS-PAGE

La séparation d'un mélange protéinique à travers un gel de polyacrylamide, permet l'analyse des multiples bandes polypeptidiques d'un échantillon donné. En procédant de cette façon, nous pouvons identifier les bandes qui composent l'antigène PI et déterminer si certaines de ces bandes sont partagées par d'autres organes tels le foie, les reins ou les testicules. Ce dernier aspect est révélé grâce à l'utilisation simultanée d'extraits salins de ces organes.

## 2.1 ANALYSE ÉLECTROPHORÉTIQUE DE PI DE COBAYE

La séparation par SDS-PAGE dans un gel en gradient de polyacrylamide (5-15%) des extraits salins de foie, de rein et de PI de cobaye à des concentrations protéiniques de 40 µgN, révèle plusieurs bandes polypeptidiques (Figure 3). Ces dernières possèdent un poids moléculaire variant entre 60 Kd et 6.5 Kd, tel que déterminé à l'aide de standards de P.M. Plusieurs de ces bandes migrent à une distance semblable dans les trois échantillons. Toutefois, deux bandes sont possiblement PI spécifiques, n'étant pas présentes dans les extraits salins d'organes (flèches). Une de ces bandes possède un P.M. de 30 Kd. Une seconde bande, plus faible d'un P.M. d'environ 40 Kd, est beaucoup plus difficilement identifiable.

## 2.2 ANALYSE ÉLECTROPHORÉTIQUE DE PI DE SOURIS

A l'aide d'un gradient de polyacrylamide (5-15%), des extraits salins de foie, de rein, et de PI de souris, sont séparés par SDS-PAGE, à des concentrations protéiniques de 75 µgN. De nombreuses bandes polypeptidiques sont identifiées (Figure 4). Les P.M. des différentes bandes varient entre 60 Kd et 6.0 Kd. Plusieurs bandes paraissent être présentes dans les trois échantillons et peuvent donc être considérées comme non-spécifiques à PI. On observe, par contre, deux bandes polypeptidiques avec des P.M. inférieurs à 17 Kd, qui ne sont pas présentes dans les deux extraits salins d'organes. Ces bandes ont environ 10.0 Kd et 8.0 Kd respectivement, et sont

possiblement spécifiques à l'antigène PI.

### III. ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay)

Cette technique permet le dosage d'anticorps anti-PI de cobaye et de souris, autant dans les sérums hétérologues de lapins hyperimmuns, que dans les sérums de cobayes ou de souris allo- ou autoimmunisés avec PI.

#### 3.1 SÉRUMS ANTI-PI HÉTÉROLOGUES

##### 3.1.1 SÉRUM ANTI-PI DE COBAYE

Le sérum anti-PI de cobaye hétérologue dilué à 1/5000, incubé avec des concentrations de 8.75 et 35  $\mu\text{gN/ml}$  de PI de cobaye, donne une densité optique légèrement au dessous de 1.4 à 450 nm, comparativement aux valeurs très faibles du sérum pré-immun. Un fait à remarquer: quand le sérum anti-PI de cobaye dilué à 1/5000 est incubé avec le PI de souris, les valeurs obtenues sont aussi faibles que celles du sérum pré-immun (Figure 5).

##### 3.1.2 SÉRUM ANTI-PI DE SOURIS

Comme dans l'exemple précédent, le sérum anti-PI de souris incubé avec du PI de souris à des concentrations de 8.75 et 35  $\mu\text{gN/ml}$ , donne des densités optiques élevées, quoique le titre est plus faible (1/1000). Lorsque ce sérum est incubé avec du

PI de cobaye, dans les mêmes conditions, on observe des valeurs presque nulles, comparativement à celles obtenues avec le sérum pré-immun (Figure 6).

### 3.2 SÉRUMS HÉTÉROLOGUES ANTI-PI ABSORBÉS AVEC DES EXTRAITS SALINS D'ORGANES ET PI

L'objectif principal de cette étude, est de confirmer ou d'infirmier l'existence d'épitopes "muqueuse-spécifiques" et d'autres épitopes partagés par le PI et les extraits d'organes (foie, rein).

#### 3.2.1 SÉRUM ANTI-PI DE COBAYE

Lorsque le sérum anti-PI de cobaye dilué à 1/5000, est incubé en présence de PI ou des extraits salins de cobaye à des concentrations protéiniques de 8.75 µgN/ml et 35 µgN/ml, les D.O. obtenus sont sensiblement les mêmes (Figure 7). Cette analyse démontre qu'il y a des épitopes communs entre le PI de cobaye et les extraits de foie, de rein et de testicules isologues.

L'absorption du sérum hétérologue anti-PI de cobaye à trois reprises avec des extraits salins de foie ou de rein provoque une réduction accentuée de la D.O., qui tombe au même niveau que celle de l'antisérum absorbé avec du PI de cobaye (Figure 8).

### 3.2.2 SÉRUM ANTI-PI DE SOURIS

L'analyse du sérum hétérologue anti-PI de souris en présence des extraits salins de foie, de rein et de testicules de souris, indique un certain degré de réactivité croisée. L'anti-PI de souris hétérologue dilué à 1/1000, incubé avec les extraits salins de foie, de rein et de testicules à des concentrations protéiniques de 8.75 et 35  $\mu\text{gN/ml}$ , révèle des valeurs positives face aux différents extraits d'organes (Figure 9). Ce sont les extraits de foie qui donnent la réaction croisée la plus élevée, tandis que les extraits de rein et de testicules de souris, donnent des valeurs plus faibles.

Lorsque l'anti-PI de souris est absorbé à quatre reprises avec les lyophilisats de foie ou de rein de souris, on observe une diminution comparable de la D.O. (Figure 10), quoique moins accentuée qu'avec l'antisérum anti-PI de cobaye dans des conditions semblables (Figure 9).

### 3.3 FRACTION GLOBULINIQUE DES SÉRUMS ANTI-PI HÉTÉROLOGUES

#### 3.3.1 FRACTION GLOBULINIQUE ANTI-PI DE COBAYE

Suite à la purification de ces immunoglobulines (Ig) par immunoabsorption, la fraction globulinique obtenue montre un niveau détectable d'anticorps anti-PI de cobaye assez élevé (Figure 11). La fraction globulinique de cet antisérum révèle un titre aussi élevé (5000) que le sérum hétérologue anti-PI de

cobaye entier, en présence de PI de cobaye à des concentrations de 8.75 et 35.0  $\mu\text{gN/ml}$ . L'analyse de la fraction non-globulinique (protéines sériques) de cet antisérum, indique des valeurs comparables à celles obtenues avec le sérum pré-immun à la même dilution.

### 3.3.2 FRACTION GLOBULINIQUE ANTI-PI DE SOURIS

La fraction globulinique de l'antisérum hétérologue anti-PI de souris, démontre également un titre d'anticorps anti-PI de souris assez élevé (1000) (Figure 12). Comparative-ment au sérum hétérologue entier dilué à 1/1000, la fraction globulinique anti-PI de souris atteint des valeurs semblables, pour une même dilution en présence de PI de souris à des concentrations protéiniques de 8.75 et 35.0  $\mu\text{gN/ml}$ . La fraction non-globulinique de l'antisérum donne des valeurs comparables à celles obtenues avec le sérum pré-immun (Figure 12).

Suite à cette étude, des absorptions multiples de la fraction globulinique anti-PI de souris, ont permis l'analyse de leur réponse spécifique. Lorsque la fraction globulinique est absorbée à quatre reprises avec des extraits salins de foie, de rein, de même que du PI de souris, on observe une inhibition comparable de la D.O. (Figure 13). La réactivité spécifique à PI est, dans ces conditions, inférieure à celle de l'antisérum non-fractionné (Figure 10).

### 3.4 SÉRUMS ANTI-PI DE COBAYE ISOLOGUES

Les cobayes ayant reçu trois doses de PI à une concentration de 5 mgN/ACF, montrent un titre très faible d'anticorps isologues anti-PI de cobaye, seulement en présence de concentrations élevées de PI (Figure 14).

### 3.5 SÉRUMS ANTI-PI DE SOURIS ISOLOGUES

Cette étude permet l'analyse de la réponse humorale de souris consanguines BALB/c et C57bl/6.

Au niveau du groupe de souris ayant reçu une seule dose de PI isologue au jour 0 et sacrifié au jour 30, les souris de souche BALB/c révèlent un niveau d'anticorps anti-PI comparable aux souris de souche C57bl/6 (Figures 15 et 16). La réactivité du sérum de souris BALB/c anti-PI de souris dilué à 1/100, en présence de PI de souris à des concentrations de 8.75 et 35.0 µgN/ml, montre des valeurs dose-dépendantes pour les souris ayant reçu une seule dose de 1000 µgN, 500 µgN et 250 µgN de PI isologue. Pour les souris témoins, ayant été injectées avec l'ACF/PBS et le PBS seul, ainsi que pour le sérum pré-immun de souris, les valeurs moyennes observées à la même dilution sont considérablement plus faibles. Pour les souris de souche C57bl/6, la réponse humorale anti-PI de souris est globalement comparable à celle obtenue avec les souris BALB/c.

Chez le groupe de souris BALB/c et C57bl/6 ayant reçu deux doses de l'immunogène, on observe une réponse différente (Figures 17 et 18). La D.O. des sérums de souris BALB/c anti-PI de souris, en présence de PI à des concentrations de 8.75 et 35.0 µgN/ml, est élevée à la dilution 1/100, et elle est dose-dépendante (Figure 17), et pour les animaux ayant reçu deux doses de 500 µgN et 250 µgN, les valeurs sont considérablement plus faibles. Les groupes témoins injectés avec l'ACF/PBS ou avec du PBS seul, ainsi que l'incubation avec le sérum pré-immun, donnent des valeurs faibles et comparables. De plus, l'analyse statistique effectuée entre le groupes de souris BALB/c ayant reçu une dose de l'immunogène à 1000 µgN et celui en ayant reçu deux doses, détermine qu'il existe une différence significative dans la réponse humorale après deux doses, en comparant ce dernier avec le groupe n'ayant reçu qu'une seule dose de PI, où  $p < 0.001$  (Figure 19). Lorsque les variances sont différentes de façon significative (test de F) pour la comparaison entre les groupes ayant reçu une et deux doses ( $p < 0.001$ ), une transformation logarithmique stabilise les variances et augmente encore plus la valeur du t de Student. Cette dernière analyse nous permet de déduire que la réponse humorale anti-PI, pour une même dose de l'immunogène, est dépendante du nombre de doses injectées par animal.

Les souris C57bl/6 ayant reçu deux doses de l'immunogène donnent une réponse humorale anti-PI de souris beaucoup plus faible (Figure 18). Le sérum dilué 1/100, puis incubé avec du PI de souris à 8,75 et 35.0 µgN/ml, révèle une D.O. très



réduite, tout en étant dose-dépendante. La réponse moyenne des souris ayant reçu également deux doses d'ACF/PBS ou de PBS seul, est similaire à la réponse du groupe de souris précédent. Une analyse comparative entre les groupes de souris BALB/c et C57bl/6 ayant reçu deux doses de l'immunogène à 1000 µgN, indique une différence significative entre la réponse humorale des souris BALB/c et celle des souris C57bl/6, où  $p < 0.001$  (Figure 19). De la même façon que pour l'analyse statistique précédente, la transformation logarithmique stabilise les variances (selon le test de F) et augmente la valeur du t de Student. La réponse humorale est donc considérablement plus élevée chez les souris BALB/c, que chez les souris C57bl/6.

Une étude plus approfondie des valeurs obtenues lors de l'analyse statistique, nous a permis de démontrer la significativité de la réponse humorale des souris BALB/c. Selon la méthode de Tukey-Kramer pour la comparaison multiple avec des valeurs de "n" différentes, le groupe de souris BALB/c ayant reçu deux doses possède une réponse humorale anti-PI plus élevée de façon significative que tout autre groupe de souris immunisées ou témoins. Les résultats de l'analyse statistique pour des valeurs géométriques donnent un  $F = 53.098$  et un  $p = 1.107 \times 10^{-15}$ , tandis que la transformation logarithmique de ces valeurs donnent un  $F = 72.2123$  et un  $p = 5.18 \times 10^{-18}$ . Donc la transformation logarithmique diminue la valeur de p sans pour autant augmenter la signification de la réponse ( $p < 0.001$ ).

Étant donné le petit volume d'antisérums anti-PI de souris ou de cobaye isologues obtenus, il nous a été impossible de procéder à des analyses d'absorption avec des extraits d'organes.

### 3.6 SÉRUMS ANTI-PI DE SOURIS AUTOLOGUES

De véritables autoimmunisations chez les souris de souche BALB/c immunisées avec deux doses de PI de souris BALB/c à une concentration de 1000  $\mu\text{gN}$ , ont complété l'analyse de la réponse humorale vis-à-vis cet autoantigène. Comparativement au groupe de souris ayant reçu deux doses de PI de souris CD-1 à la même dose, la réponse humorale des sérums autologues est comparable (Figure 20). Les valeurs obtenues de chacun des animaux sont exprimées individuellement. La moyenne pour chacun des groupes est comparée à la moyenne + deux fois la valeur de l'écart-type, exprimée par une droite pointillée traversant la figure. Lorsque les échantillons sériques anti-PI de souris des sérums autologues et isologues dilués à 1/100 sont incubés en présence de PI de souris à une concentration de 35.0  $\mu\text{gN/ml}$ , les D.O. obtenus à 450 nm pour les sérums isologues et autologues sont sensiblement les mêmes. La comparaison de ces deux groupes par le test t de Student (t indépendant) avec les valeurs obtenues par les échantillons témoins indique une différence significative ( $p < 0.001$ ). Comme pour l'analyse des sérums isologues, lorsque les variances sont différentes de façon significative (test de F) pour la comparaison des souris BALB/c alloimmunisées ou autoimmunisées avec le groupe témoin, la

transformation logarithmique stabilise le test et le rend plus robuste par rapport au non-respect de la normalité, avec des valeurs de  $p$  de  $1.5 \times 10^{-13}$  et  $3.0 \times 10^{-9}$  respectivement. De plus, lorsque la comparaison de l'ensemble des souris allo- et autoimmunisées est effectué avec le groupe témoin,  $F = 201.2$  et  $p = 3.0 \times 10^{-12}$ , et la transformation logarithmique donne un  $F = 381.16$  sans changer la valeur de  $p$ .

#### IV. IMMUNOBUVARDAGE

Les marqueurs immunoenzymatiques sont largement utilisés pour identifier la réactivité de certains anticorps spécifiques à certains déterminants antigéniques d'un mélange polypeptidique séparé par électrophorèse SDS-PAGE. Une réplique des polypeptides du gel est effectuée par le transfert de l'ensemble des bandes polypeptidiques séparées, sur une membrane de nitrocellulose par électrotransfert. Cette méthode sensible permet donc d'effectuer une analyse immunochimique des épitopes spécifiques pouvant être impliqués dans le développement de la réaction autoimmune induite chez ces animaux.

##### 4.1 ANALYSE IMMUNOCHIMIQUE DE PI DE COBAYE

Les échantillons d'extraits de foie, de rein et de testicules, de même que de PI de cobaye à une concentration de 45  $\mu\text{gN}$ , ou de 900  $\mu\text{gN}$  pour le gel entier, sont séparés par SDS-PAGE avec un gradient de polyacrylamide (5-15%), puis transférés sur nitrocellulose. L'analyse des déterminants

antigéniques présents est effectuée à l'aide des sérums anti-PI de cobaye hétérologue et isologue, absorbés ou non. L'incubation avec un sérum anti-immunoglobulines de l'espèce correspondante au premier anticorps, marqué à la peroxidase, et le développement de la réaction immunochimique respective, permet d'identifier les bandes polypeptidiques réactives.

#### 4.1.1 ANALYSE AVEC LE SÉRUM ANTI-PI DE COBAYE HÉTÉROLOGUE

L'analyse de la spécificité des anticorps de sérums anti-PI de cobaye hétérologue, montre un certain nombre de bandes partagées entre les échantillons (Figure 21). Lors de l'incubation du sérum hétérologue dilué 1/500 avec les extraits salins de foie et de PI, on observe quatre bandes polypeptidiques non-partagées et présentes uniquement au niveau de PI. Lorsque l'on compare les positions respectives des bandes polypeptidiques migrées, avec celles des standards de P.M., le poids moléculaire respectif des bandes est approximativement de 55, 46, 30 et 14 kD. Les échantillons de foie et PI, incubés avec les mêmes dilutions de sérum pré-immun de lapin, ne révèlent aucune des bandes ci-dessus mentionnées (Figure 21).

#### 4.1.2 ANALYSE AVEC LA FRACTION GLOBULINIQUE DU SÉRUM ANTI-PI DE COBAYE HÉTÉROLOGUE

Lorsque les extraits de foie, de rein, de même que de PI de cobaye, séparés par électrophorèse, électrotransférés sur membrane de nitrocellulose, sont incubés avec la fraction

globulinique du sérum hétérologue anti-PI de cobaye dilué 1/50, on observe qu'une seule bande partagée entre le PI et l'extrait de rein, à 14.3 Kd de poids moléculaire. Deux bandes spécifiques au PI ont un poids moléculaire d'environ 30 Kd et 50 Kd respectivement. Ces mêmes échantillons incubés avec la fraction globulinique du sérum pré-immun, à la même dilution, ne révèlent aucune bande (Figure 22).

#### 4.1.3 ANALYSE AVEC LE SÉRUM ANTI-PI DE COBAYE HÉTÉROLOGUE ABSORBÉ AVEC DES EXTRAITS D'ORGANES ET DE PI DE COBAYE

L'analyse subséquente du sérum hétérologue anti-PI de cobaye entier, incubé avec un extrait salin de foie, de même qu'avec du PI de cobaye, nous permet de mieux connaître les relations existantes entre les bandes considérées comme "PI-spécifiques" et celles partagées avec les autres organes. En effet, cette absorption montre de façon plus sélective et spécifique les bandes polypeptidiques spécifiques au PI de cobaye (Figure 23). Lorsque les extraits salins de foie, de rein et de PI de cobaye électrotransférés, sont incubés individuellement avec l'anti-PI de cobaye absorbé avec l'extrait de foie ou de rein et dilué à 1/100, on n'observe aucun effet majeur au niveau des bandes spécifiques à PI. Toutefois, les bandes spécifiques à PI sont éliminées uniquement lorsqu'elles sont incubées avec l'anti-PI absorbé avec l'antigène PI de cobaye. Donc, des absorptions de l'antisérum avec les lyophilisats d'organes permettent de mettre en évidence trois (3) bandes entre 30 et 46 Kd et une

(1) bande à 14 Kd, spécifiques à l'antigène PI de cobaye. Des témoins négatifs ont été effectués avec le sérum pré-immun de lapin, à la même dilution (1/100).

#### 4.1.4 ANALYSE DE PI DE COBAYE AVEC LES SÉRUMS ANTI-PI DE COBAYE ISOLOGUE

L'analyse immunochimique par immunotransfert des alloanti-sérums dirigés contre le PI de cobaye, révèle des résultats similaires à ceux obtenus et observés lors d'incubations avec le sérum hétérologue anti-PI de cobaye. Toutefois, le nombre de bandes partagées entre l'extrait salin de foie et l'antigène PI, est beaucoup moindre (Figure 24). Lorsque les alloanti-sérums de cobaye dilués à 1/10 sont incubés avec l'extrait salin de foie et l'antigène PI de cobaye électrotransférés sur nitrocellulose, on observe au moins une bande spécifique à PI d'environ 30 Kd de poids moléculaire qui n'est pas partagée avec l'extrait salin de foie. Une deuxième bande spécifique à PI, d'un poids moléculaire de près de 46 Kd, n'est aucunement partagée avec l'extrait salin de foie de cobaye.

#### 4.2 ANALYSE IMMUNOCHIMIQUE DE PI DE SOURIS

Les échantillons d'extraits de foie, de rein, ainsi que de PI de souris BALB/c et CD-1 sont séparés par électrophorèse SDS-PAGE, utilisant un gradient de polyacrylamide (5-15%). La concentration protéinique de ces échantillons est de 75 µgN/puits ou de 1650 µgN pour l'ensemble du gel. Suite à la

séparation des bandes polypeptidiques, ces dernières sont transférées sur une membrane de nitrocellulose par électrotransfert. L'analyse des déterminants antigéniques spécifiques à PI, est effectuée à l'aide d'antisérums anti-PI de souris hétérologue, iso- et autologues absorbés ou non.

#### 4.2.1 ANALYSE AVEC LE SÉRUM ANTI-PI DE SOURIS HÉTÉROLOGUE

Cette analyse révèle certaines bandes polypeptidiques immunoréactives qui sont partagées entre les différents échantillons (Figure 25). Lorsque le sérum hétérologue anti-PI de souris dilué à 1/700 est incubé avec les extraits salins de foie, de rein et de PI de souris, on observe une à deux bandes polypeptidiques n'étant pas partagées avec les extraits salins de foie et de rein de souris, et présentes uniquement au niveau de PI. De plus, on remarque que pour une même concentration protéinique, le PI de souris BALB/c est plus immunoréactif que le PI de souris CD1. Leurs poids moléculaires se situent autour de 10 Kd. Le pool de sérum pré-immun n'indique aucune bande immunoréactive.

#### 4.2.2 ANALYSE AVEC LA FRACTION GLOBULINIQUE DU SÉRUM ANTI-PI DE SOURIS HÉTÉROLOGUE

Lorsqu'une étude semblable est effectuée en utilisant la fraction globulinique de l'anti-PI de souris hétérologue, les bandes PI-spécifiques sont mieux définies (Figure 26). Les deux bandes spécifiques à PI, identiques à celles identifiées

avec l'antisérum hétérologue (Figure 25), ont un poids moléculaire de 10 Kd environ. L'incubation avec le sérum pré-immun ne révèle aucune bande.

#### 4.2.3 ANALYSE AVEC LE SÉRUM ANTI-PI DE SOURIS HÉTÉROLOGUE ABSORBÉ AVEC DES EXTRAITS D'ORGANES ET PI DE SOURIS

L'analyse précédente effectuée avec le sérum hétérologue anti-PI de souris, incubé avec les extraits salins de foie, de rein, ainsi que de PI de souris BALB/c et CD1, montre un certain nombre de bandes partagées entre ces extraits. Ces bandes non-spécifiques à l'antigène PI, peuvent être éliminées par de multiples absorptions avec les lyophilisats d'organes, démontrant ainsi un certain partage antigénique. Ces absorptions montrent plus sélectivement les bandes polypeptidiques spécifiques à PI de souris (Figure 27). Ces absorptions n'ont aucun effet majeur sur les bandes PI spécifiques, d'un poids moléculaire d'environ 10 Kd. Toutefois, les bandes spécifiques à PI ne sont pas entièrement éliminées lorsqu'elles sont incubées avec l'antisérum absorbé avec le PI, mais on observe une atténuation marquée de la réactivité. Des incubations avec les sérums pré-immuns donnent des résultats négatifs.

#### 4.2.4 ANALYSE DE PI DE SOURIS AVEC LES SÉRUMS ANTI-PI DE SOURIS ISOLOGUES

L'analyse immunochimique par immunotransfert avec le PI et un extrait salin d'organe de souris, incubés avec des alloanti-



sérums anti-PI de souris, révèle des résultats comparables à ceux obtenus avec l'anti-PI de souris hétérologue, sauf que les bandes partagées entre l'extrait de foie et le PI, sont éliminées. Seules les bandes PI spécifiques y sont évidentes, quoique d'une intensité atténuée (Figure 28). Un pool des allo-anti-PI de souris obtenus au jour 60 après deux doses de 1000 µgN de l'alloantigène, est dilué à 1/20 puis incubé avec le PI de souris et l'extrait salin de foie électrotransférés sur membrane de nitrocellulose. On observe deux bandes polypeptidiques immunoréactives, d'un poids moléculaire se situant environ à 10 Kd et qui ne sont d'aucune façon partagées avec l'extrait de foie. Au niveau de ce dernier, aucune bande immunoréactive n'est révélée. De plus, lorsque l'alloantisérum est absorbé avec le lyophilisat de foie de souris, puis incubé à la même dilution avec du PI et l'extrait de foie, aucune modification majeure est effectuée sur les deux bandes spécifiques au PI. Également, des témoins négatifs ont été obtenus en incubant un pool de sérums pré-immuns dilué à 1/20, avec les bandes polypeptidiques de PI et de foie de souris électrotransférées sur nitrocellulose. Ces incubations témoins ne révèlent aucune bande immunoréactive.

#### 4.2.5 ANALYSE DE PI DE SOURIS AVEC LES SÉRUMS ANTI-PI DE SOURIS AUTOLOGUES

Des cédules d'autoimmunisations chez des souris de souche BALB/c, immunisées avec du PI extrait à partir de souris de même souche, ont permis d'obtenir des antisérums anti-PI de

souris BALB/c autologues.

L'analyse immunochimique des autoanticorps anti-PI, incubés sur PI et sur l'extrait de foie de souris autologue, électrotransférés sur nitrocellulose, révèle des résultats similaires à ceux obtenus auparavant avec des alloantisérums (Figure 29). Un "pool" des sérums anti-PI de souris autologues, dilué à 1/20, incubé avec les bandes polypeptidiques de PI et de foie autologues, électrotransférés, ne permet d'identifier aucune bande partagée entre l'extrait de foie de souris BALB/c et le PI de souris BALB/c. Les deux bandes majeures observées lors de l'incubation avec les sérums hétérologues ou leurs fractions globuliniques (Figures 25 et 26), sont identiques à celles révélées avec l'antisérum autologue. Les témoins négatifs effectués avec les mêmes échantillons, incubés avec un pool de sérum pré-immun dilué à 1/20, ne montrent aucune bande immunoréactive.

## DISCUSSION

Des travaux effectués dans notre laboratoire, ont démontré que des doses uniques ou multiples de PI isologue, induisent une entérocólite autoimmune avec des lésions au niveau intestinal, ressemblant à celles qui apparaissent dans les IBD. Du point de vue immunologique, il y a apparition d'une réponse à médiation cellulaire et humorale anti-PI chez le cobaye (126,127). De plus, par des tests d'immunodiffusion radiale, des anticorps hétérologues de lapin anti-PI de cobaye, réagissent face à des extraits salins de foie, de rein et de testicules isologues. Des absorptions multiples avec ces derniers, ont rendu ces antisérums oligospécifiques face à l'antigène PI, en éliminant les réactions croisées avec les extraits salins d'organes (127).

Les résultats présentés ici avaient comme objectif, d'approfondir l'analyse immunochimique de l'antigène PI de cobaye et de souris. Nous avons démontré l'existence d'épitopes communs entre le PI de cobaye ou de souris et des extraits salins de foie, de rein et de testicules isologues, tel que montré par SDS-PAGE. Suite à cette étude, l'utilisation de sérums hétérologues anti-PI, a permis d'appuyer ce partage antigénique, révélant de plus, des différences antigéniques entre les PI xénogéniques, suggérant un degré de spécificité d'espèce. Toutefois, la fraction globulinique de ces sérums, des protocoles d'absorptions avec des lyophilisats d'organes isologues et des anticorps isologues ou autologues anti-PI, ont permis de démontrer la présence possible d'épitopes iso- ou autologues spécifiques d'organes

reliés à PI, tel qu'analysé par ELISA et Immunobuvardage. De plus, nos résultats démontrent que les souris BALB/c sont plus susceptibles au développement d'une réponse immune à médiation humorale, contre le PI isologue ou autologue. Des souris C57bl/6, ayant reçu une ou deux doses de l'immunogène, de même que les souris BALB/c, ayant reçu une seule dose, ont montré une faible réponse humorale anti-PI.

Tel que mentionné initialement, depuis les vingt dernières années, les recherches ont fourni un nombre considérable de connaissances au niveau de l'autoimmunité, des autoépitopes spécifiques d'organes ou systémiques, ainsi qu'au niveau des caractéristiques de la réponse immune dans certains syndrômes autoimmuns (172). Les recherches concertées de la biologie moléculaire, de la biochimie et de l'immunologie tentent aujourd'hui de confirmer la présence d'autoépitopes spécifiques d'organes ou non, par leurs caractéristiques antigéniques, physicochimiques et immunogénétiques (173). Parallèlement, la présence d'autoanticorps dirigés contre certains autoantigènes, a été assez bien démontrée dans le cas de certaines maladies autoimmunes spécifiques d'organes ou systémiques (108). Les recherches effectuées dans notre laboratoire, selon cette même approche, soit de caractériser les épitopes pouvant être spécifiquement impliqués dans l'induction d'une entérocolite autoimmune expérimentale (ECA), pourraient appuyer l'hypothèse de l'existence de processus autoimmuns dans les IBD et également, de les classer dans l'une ou l'autre des catégories de maladies autoimmunes.

L'étude et la caractérisation de l'antigène isologue ou autologue utilisé dans nos expériences, permettent de fournir de plus amples informations sur les épitopes spécifiques immunoréactifs, impliqués dans l'induction et le maintien de cette réponse humorale autoimmune. Également, les tentatives de corrélations entre le titre des anticorps anti-PI, la pathologie de l'intestin (128) et le contrôle génétique de la réponse immune, mettent en évidence la pathogénèse multifactorielle dans la ECA.

Plusieurs techniques immunologiques et immunochimiques ont été utilisées, lors de l'étude des déterminants antigéniques, impliqués de façon spécifique dans les réactions de type autoimmun. Parmi celles-ci, on peut mentionner les tests d'immunodiffusion (127,144), d'immunofluorescence (123) et d'hémagglutination (139). L'utilisation d'un test "in vitro" beaucoup plus sensible, tel que celui de l'ELISA, permet une évaluation plus approfondie de la réponse humorale (180,202).

Ce dernier test nous permet d'établir que la réactivité croisée, entre le PI de cobaye et celui de souris, est relativement faible, en utilisant des anticorps hétérologues obtenus chez le lapin. En outre, des études de notre laboratoire, ont permis de démontrer par des cédules d'immunisations avec du PI de source xénogénique, que leur pathogénicité est réduite. Il est possible que les différences entre les PI de cobaye et de souris, tel que démontré par SDS-PAGE et ELISA, soit à la base de cette faible pathogénicité croisée. Ainsi, nous pouvons

conclure à l'existence d'une certaine spécificité d'espèce. Le groupe de Roche (152) a démontré la présence d'un antigène spécifique d'organe au niveau de l'intestin grêle de rat. Un antisérum hétérologue dirigé contre cette glycoprotéine, révèle la présence d'anticorps précipitants spécifiques à l'espèce et aucune réactivité avec ce même antigène de sources xénogéniques de boeuf, d'ovin et de porc. Des autoantigènes capables de déclencher des syndrômes autoimmuns, tels que ceux extraits du cerveau ou du cristallin, possèdent aussi un faible degré de réactivité croisée entre les espèces (216).

L'analyse par ELISA nous a aidé à établir que les sérums hétérologues anti-PI de cobaye ou de souris, dénotent un haut niveau de réactivité croisée entre l'antigène PI et les extraits salins d'organes isologues. Toutefois, des protocoles d'absorptions consécutives avec des extraits d'organes isologues, nous ont permis d'analyser la spécificité de l'antigène PI. Ces protocoles ont été appuyés par un certain nombre d'absorptions, déterminées en fonction de l'obtention d'un plateau de la réponse humorale face au PI isologue. Ainsi, les procédures d'absorptions sont arrêtées lorsque des résultats similaires du titre des anticorps sont obtenus, lors de l'analyse de deux échantillons successifs par ELISA.

Cette méthode nous a permis de démontrer que des absorptions avec un extrait de foie de cobaye, réduisent considérablement la réactivité de l'anti-PI de cobaye hétérologue, avec le PI isologue. Toutefois, le protocole d'absorptions effectué

avec l'extrait de rein isologue, annule presque totalement le niveau de réactivité avec le PI. Cette disparition importante de réactivité est possiblement due à un grand partage antigénique entre le PI de cobaye et l'extrait salin de rein isologue. De plus, ces observations laissent entrevoir l'existence d'une très faible réactivité spécifique du sérum hétérologue face à l'antigène PI. Parallèlement, les analyses d'absorptions avec l'anti-PI de souris hétérologue, nous indiquent un niveau de réactivité différent de celui obtenu avec l'antisérum hétérologue anti-PI de cobaye. De multiples absorptions avec des extraits de foie ou de rein isologues, révèlent une réduction du niveau de la réponse humorale, tout en conservant un niveau de spécificité face à l'antigène PI de souris plus élevé que celui obtenu dans le cas de l'anti-PI de cobaye hétérologue. De plus, au niveau de la chute de réactivité des antisérums absorbés avec du PI de souris, on ne remarque aucune différence significative obtenue entre les extraits de foie et de rein isologues. Ces résultats nous indiquent donc que nous avons obtenu des anticorps spécifiques à l'antigène PI, toutefois, sans déterminer le nombre d'épitopes spécifiques et leur poids moléculaire relatif. Certaines études signalent la présence d'anticorps possédant un niveau significatif de réactivité croisée avec des extraits tissulaires autres que celui utilisé lors de l'obtention de ces antisérums. Mentionnons des travaux effectués pour la production d'autoanticorps contre le foie, le rein, le cerveau, le coeur, le muscle ou la rate de lapin (7). Des techniques d'absorptions ont permis à Rabin (144), d'obtenir des antigènes



spécifiques aux différents segments du tube digestif.

La séparation électrophorétique en gradient de polyacrylamide SDS-PAGE de l'antigène PI de cobaye, prouve qu'en plus des bandes polypeptidiques partagées avec des extraits salins de foie et de rein isologue, un certain nombre de bandes semblent spécifiques à l'antigène PI étudié. Il existe au moins deux bandes spécifiques ayant des poids moléculaires de 30 Kd et 60 Kd. Ces bandes ne sont pas partagées avec les extraits d'organes isologues. Pour ce qui est du PI de souris, deux bandes spécifiques sont également présentes, n'étant aucunement partagées avec les extraits d'organes isologues. Ces deux bandes sont très près l'une de l'autre et possèdent un poids moléculaire d'environ 10 Kd et 8 Kd respectivement. Ces épitopes sont possiblement ceux identifiés par des expériences d'absorptions avec des extraits d'organes isologues qui possèdent un certain degré de réactivité croisée avec le PI. L'analyse électrophorétique fut également utilisée, lors d'expériences démontrant la présence de déterminants antigéniques spécifiques et uniques, au niveau d'extraits de cellules épithéliales du colon de souris (6), et de rats (71).

Les techniques immunoenzymatiques sont largement utilisées depuis cette dernière décennie, en ce qui concerne l'immunolocalisation de déterminants antigéniques spécifiques à l'intérieur d'un mélange polypeptidique complexe. L'immunotransfert combine la résolution de bandes polypeptidiques séparées par SDS-PAGE, avec la grande sensibilité des techniques de

marqueurs immunoenzymatiques. Ainsi, la réplique des bandes polypeptidiques séparées par SDS-PAGE peut être analysée avec un plus haut niveau de sensibilité et de résolution (13,58,59,193).

L'analyse par immunotransfert de l'antisérum hétérologue anti-PI de cobaye, nous a permis d'identifier les bandes polypeptidiques de PI de cobaye Hartley, pouvant être spécifiques à cet antigène. Les résultats obtenus antérieurement par ELISA, avec l'antisérum absorbé avec les extraits d'organes isologues, révèlent une réactivité spécifique très faible ou semblable à celle obtenue avec l'antisérum absorbé avec PI. Même selon ces observations, les anticorps hétérologues absorbés avec l'extrait de rein et de foie isologue, de même que la fraction globulinique de cet antisérum, permettent l'identification de deux bandes PI-spécifiques. Ces résultats indiquent ainsi, que l'antisérum hétérologue anti-PI de cobaye, utilisé dans cette analyse, reconnaît également les déterminants antigéniques reliés aux deux bandes identifiées précédemment par SDS-PAGE. Ces dernières ont un poids moléculaire de 30 et 46 Kd, et deux autres non-identifiées par cette technique; une entre 30 et 46 Kd et l'autre de 14 Kd. Toutefois, les incubations à l'aide de la fraction globulinique de cet antisérum, indiquent deux bandes spécifiques à PI, qui semblent être les deux bandes identifiées par SDS-PAGE. Ces bandes sont d'un poids moléculaire de 30 Kd et 50 Kd respectivement. Les incubations avec le sérum hétérologue anti-PI de cobaye, ont révélé un bon

nombre de bandes immunoréactives avec le PI, contrairement à l'incubation avec la fraction globulinique de ce même sérum. Ces observations sont probablement dues à l'élimination de protéines sériques non-spécifiques, ainsi qu'à la purification des anticorps anti-PI, qui nous ont permis une élimination de bandes non-spécifiques. L'analyse par immunotransfert de l'antisérum isologue anti-PI de cobaye révèle une à deux bandes uniques à l'antigène PI de cobaye pouvant être identifiées. Ces bandes semblent être en relation avec celles identifiées avec l'antisérum hétérologue absorbé ou avec la fraction globulinique et les bandes spécifiques obtenues par SDS-PAGE, ayant des poids moléculaires près de 46 Kd et de 30 Kd.

L'analyse par immunotransfert de l'antisérum hétérologue anti-PI de souris, indique également des résultats de partages antigéniques et de déterminants spécifiques à l'antigène PI de souris. L'étude de l'antisérum hétérologue non-absorbé et absorbé avec les extraits salins de foie ou de rein isologue, ou de la fraction globulinique de ce même antisérum, révèle une à deux bandes spécifiques au PI telles qu'identifiées antérieurement par SDS-PAGE et qui possèdent des poids moléculaires d'environ 10 Kd et 8 Kd. L'analyse par immunotransfert avec les antisérums isologues et autologues anti-PI de souris CD1 et BALB/c respectivement, vient supporter les résultats obtenus avec l'antisérum hétérologue anti-PI de souris. Deux bandes polypeptidiques ont été clairement identifiées. Elles sont homologues aux bandes antérieurement démontrées par SDS-PAGE, ainsi que par immunotransfert avec l'antisérum hétérologue

absorbé ou non et avec la fraction globulinique. De multiples absorptions de cet antisérum isologue avec des lyophilisats de foie, de rein, de même que de PI isologue, n'abolissent pas complètement la réactivité des bandes spécifiques à l'antigène PI.

Cette méthode à haute résolution et très sensible, fut également utilisée dans l'identification d'autoépitopes, dans l'étude de maladies autoimmunes et de certains modèles expérimentaux. Mentionnons l'identification et la localisation de déterminants antigéniques spécifiques au niveau des mitochondries, dans l'étude de maladies autoimmunes hépatiques (108). De plus, l'identification d'un autoantigène microsomal des cellules pariétales, impliqué dans la gastrite autoimmune, fut identifié par ELISA (83) et par immunotransfert (40,84).

Nos travaux ont permis de démontrer que certains déterminants antigéniques de l'antigène PI sont partagés avec d'autres organes, tandis que d'autres déterminants sont uniquement présents au niveau de PI et reconnus comme étant "PI-spécifiques". Les termes autoantigène et autoanticorps, manifestés par les antisérums isologues et autologues, semblent être définitivement présents dans les ECA. Mais, selon Mackay et collaborateurs (108), l'analyse de modèles autoimmuns requiert une identification encore plus précise et sophistiquée au niveau de l'implication et de la structure des autoépitopes, pour lesquels, certains autoanticorps sont dirigés. L'utilisation d'anticorps monoclonaux monospécifiques dirigés

contre ces autoépitopes, donnera un meilleur aperçu des déterminants antigéniques impliqués. On peut mentionner l'utilisation d'anticorps monoclonaux dans l'identification des déterminants antigéniques spécifiques ou non au niveau de l'épithélium intestinal humain et murin (106). Dans ce même contexte, l'obtention de mAb dans l'identification de déterminants antigéniques spécifiques à l'épithélium intestinal de patients atteints d'IBD (143), ou spécifiques à de multiples antigènes du tube digestif humain, de nutriments et de bactéries (31), et même, spécifiques à l'ADN (149), est d'une importance considérable. De plus, l'utilisation d'anticorps anti-Id serait un atout, dans la caractérisation des autoépitopes spécifiquement impliqués dans les maladies autoimmunes expérimentales (221). Ces Id, qui sont la réplique des autoépitopes, sont à la base de l'autorégulation des processus autoimmuns.

Certaines maladies autoimmunes expérimentales sont assez bien caractérisées (108). Les meilleurs exemples de maladies autoimmunes spécifiques à un organe, pour lesquelles les autoépitopes sont identifiés, sont: l'encéphomyélite autoimmune expérimentale (EAE) (148), qui est induite chez l'animal par des injections de protéines basiques de la myéline (BPM) émulsifiée dans l'ACF; la thyroïdite autoimmune expérimentale (EAT), induite chez plusieurs espèces animales par des injections de thyroglobuline homologue mélangée dans l'ACF (213,210). L'uvéorétinite autoimmune expérimentale (EAU), induite par l'injection de protéines de la rétine émulsifiée

dans l'ACF (30), et la myasthénia gravis autoimmune expérimentale (MG), induite par l'injection de récepteurs de l'acétylcholine (AChR) (54) ou par des anticorps monoclonaux anti-AChR (151), sont d'autres exemples. Egalement, les exemples les plus populaires de maladies autoimmunes expérimentales systémiques, pour lesquelles certains autoépitopes spécifiques sont identifiés, incluent le lupus érythémateux systémique (SLE) et les désordres s'y reliant (108,172). Ces modèles expérimentaux sont observés chez les souris New Zealand Black (NZB) (183), bien qu'il reste encore beaucoup à approfondir.

Les souris BALB/c ont révélé des niveaux détectables ainsi qu'une synthèse significative d'anticorps anti-PI de souris CD-1 (isoanticorps), de même qu'une véritable production d'autoanticorps anti-PI de souris BALB/c, tel que démontré par le test immunoenzymatique ELISA. Par ailleurs, ce même groupe de souris développent une réponse immune à médiation cellulaire. Ces animaux développent également des altérations pathologiques au niveau de l'intestin (128). Toutefois, les souris BALB/c n'ayant reçu qu'une seule dose de PI isologue et les souris C57bl/6 ayant reçu une ou même deux doses de ce même immunogène, ne synthétisent que des taux marginaux d'anticorps anti-PI. Ces groupes mentionnés ci-dessus, ont toutefois développé une réponse à médiation cellulaire et très peu ont démontré la présence de lésions histopathologiques (128).

Nous pouvons donc, par ces résultats, apporter certaines conclusions. Les titres d'anticorps anti-PI isologues ou autologues circulants, sont en étroite relation avec le nombre de doses et la concentration de PI utilisées. Certaines études, notamment sur la thyroïdite autoimmune expérimentale (EAT) ou la thyroïdite autoimmune humaine (AIT), ont démontré un taux détectable d'anticorps contre la thyroglobuline en relation directe avec la pathogénécité de la maladie (172). Également, au niveau de l'analyse de la réponse autoimmune de la EAT, on observe chez les souris C<sub>3</sub>H, une réponse considérable d'autoanticorps en relation avec la dose d'antigène injectée (156). Dans la MG expérimentale, l'administration de mAb épitopes-spécifiques, à différentes concentrations, provoque une réponse où le degré de la pathologie est en relation avec la quantité de mAb administrée (151). Ainsi, la production d'anticorps détectables est possiblement en relation avec les caractéristiques histopathologiques de notre modèle expérimental d'entérocolite autoimmune (ECA).

Nos résultats fournissent des évidences consistantes avec un mécanisme de contrôle génétique de la susceptibilité au développement de l'ECA. En effet, les souris BALB/c sont susceptibles à l'induction de l'ECA, tandis que les souris C57bl/6 sont résistantes. Cette susceptibilité, liée à certains haplotypes des antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité, a été étudiée dans certaines maladies autoimmunes expérimentales. Par exemple, dans la thyroïdite autoimmune expérimentale (EAT), induite chez la souris à l'aide de la

thyroglobuline de souris (112,156), ainsi que la conversion de souches "low-responders" en "high-responders" par l'utilisation d'agents immunosuppresseurs (la cyclophosphamide entre autres) (199). Dans l'orchite autoimmune expérimentale de la souris (EAO), la susceptibilité à l'induction de cette maladie chez les souris BALB/c et C57bl/10, paraît être liée aux gènes codés par le complexe majeur d'histocompatibilité H-2, à l'intérieur de la région H-2D<sup>d</sup> (188). La EAE est la maladie autoimmune expérimentale la plus étudiée dans ce sens. Chez le rat, entre autres, la haute susceptibilité des souches de rat Lewis et DA a été démontrée (55). Ils ont établi une relation entre la susceptibilité au développement de la EAE chez le rat Lewis et (Lewis x BN)F1, avec un locus du MHC, désigné Ir-EAE (215). Chez le cobaye, on démontre également l'existence de souches susceptibles à l'induction de la EAE (186). Toutefois, les modèles expérimentaux murins sont les plus développés (16,102, 104,105), grâce à l'existence de nombreuses souches pures, bien caractérisées du point de vue génétique. De plus, certaines études sur la susceptibilité à l'induction de la EAE chez la souris, ont permis la détection de sous-souches distinctes de souris BALB/c plus ou moins susceptibles (74,187). D'autres études révèlent que la susceptibilité à une réponse immunitaire vis-à-vis un autoantigène (15) ou un alloantigène (63), implique non seulement des anticorps, mais également plusieurs sous-populations cellulaires (15,63). Chez des souches murins possédant différents haplotypes H-2, un nombre limité de sites antigéniques différents semble apte à l'induction d'une réponse des cellules T contrôlées génétiquement. Contrairement, la



réponse anticorps peut être induite face à plusieurs sites antigéniques différents. Elson et al (42), mentionnent l'implication de certains haplotypes du MHC associés à la pathogénèse des maladies inflammatoires de l'intestin.

La tolérance immunitaire implique que les autoépitopes sont sous le contrôle des lymphocytes T, mais que les autoanticorps circulants "naturels", sont non seulement sous l'influence des lymphocytes Ts/Th (119,164,130), mais également sous l'influence du système idiotypique (221). Dans ce contexte, une déficience en lymphocytes Ts pourrait être à la base du processus de déséquilibre de l'immunorégulation qui mène à la réaction autoimmunitaire (130). Certaines études, entre autres, démontrent que les lymphocytes Ts préviennent l'induction d'encéphalomyélite expérimentale chez la souris (17), ou la production d'autoanticorps dirigés contre les globules rouges murins adultes (119). Parallèlement, certains auteurs ont induit des maladies autoimmunes expérimentales, telles la EAT (199) et la EAU (30), chez des souches murins peu réceptives au départ, par le pré-traitement à l'aide d'une drogue immunosuppressive, la cyclophosphamide.

Des maladies autoimmunes expérimentales, présentant des caractéristiques autoimmunes similaires à celles observées chez l'humain, ont été produites chez l'animal par des immunisations avec un antigène homologue ou isologue mélangé avec de l'adjuvant complet de Freund. Parmi celles-ci, mentionnons la EAU induite chez la souris (30), la EAE et la EAO (187), et la

ECA (126). Selon Witebsky (216), le rôle de l'ACF semble être essentiel dans l'induction de la maladie autoimmune expérimentale ainsi que de la production d'autoanticorps. L'adjuvant complet (ACF) est une substance qui, lorsqu'administrée avec un antigène quelconque, augmente et modifie d'une manière non-spécifique, la réponse immune face à cet antigène (45).

Les mécanismes impliqués dans le processus autoimmun sont particulièrement appréciables dans le cas de la thyroïdite autoimmune (AIT et AET) (18,172). Les mécanismes impliqués dans la pathogénèse de processus autoimmuns, semblent impliquer les réactions immunes de type I anaphylactique, type II cytotoxique, type III complexes immuns et de type V médiation cellulaire. Ces mécanismes peuvent être rehaussés par des systèmes d'amplification impliquant la médiation humorale et cellulaire. Les autoanticorps circulants, peuvent être impliqués surtout au niveau de la cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC) (172). Ils peuvent être également incorporés à des complexes immuns, qui fixent le complément et ainsi initier les processus inflammatoires.

Les sous-populations de cellules T jouent un rôle fondamental dans le contrôle de la réponse autoimmune (136,156). Trois rôles des cellules T ont été démontrés, mettant l'emphasis sur les sous-populations de lymphocytes T ou de multiples fonctions pour une même sous-population. Ces activités régulatrices incluent, (1) les lymphocytes T auxiliaires responsables de l'initiation de la réponse

autoimmune expérimentale (53). Ces lymphocytes reconnaissent l'antigène isologue ou autologue sous sa forme native; (2) les lymphocytes T suppresseurs préviennent naturellement la prolifération de clones de cellules T auxiliaires autoréactifs, même chez des souches génétiquement réceptives. Leur rôle est généralement dirigé vers la prévention de lésions autoimmunes, plutôt que vers la régulation la de synthèse d'autoanticorps; et (3), les lymphocytes T effecteurs qui semblent être contrôlés génétiquement et indépendamment des T auxiliaires et T suppresseurs qui déterminent la sévérité du processus autoimmun en présence de gènes Ir "bon répondeurs". Ainsi, on observe généralement au niveau des mécanismes autoimmuns, un déséquilibre du ratio  $T_H/T_S$ . Ce déséquilibre est influencé par la concentration et le mode de présentation de l'immunogène.

Plusieurs modèles expérimentaux de ECA ont été proposés (117). La plupart sont des modèles où l'on observe des lésions uniquement au niveau du colon et sont des modèles démontrant peu de mécanismes physiologiques et immunologiques chez l'animal. La production d'entérites chroniques peut-être provoquée par l'ingestion de fines particules étrangères (33), par l'administration d'inhibiteurs de la pepsine (111), et par l'instillation de dinitrochlorobenzène (DNCB). Des entérocolites peuvent être provoquées par des instillations de formaline (90), d'acide dilué (110), de carragénine (209), ou par des peptides chimiotactiques pour les leukocytes polymorphonucléaires (34). Également, des fragments purifiés de paroi bactérienne, injectés au niveau de la paroi intestinale de

l'intestin grêle et du caecum, produisent une entérocolite granulômateuse (10). Certaines hypothèses étiologiques ont, de plus, été soumises dans l'implication d'antigènes bactériens (166). Des études sur les réactions greffe contre hôte au niveau de l'intestin, ont été effectuées pour démontrer l'implication possible des cellules cytotoxiques (121,122). Des mécanismes autoimmuns ont été déclenchés chez des souches pures de rats (71,153), à l'aide de glycoprotéines extraites de l'intestin grêle (152). Ces analyses ont également été reportées au niveau murin (6).

Dans la littérature, il existe de nombreux travaux qui signalent la présence de mécanismes autoimmuns dans la pathogénèse des maladies inflammatoires de l'intestin (92,93,164,173,178 220,218). Les résultats de nos travaux sont favorables et appuient la possibilité de processus autoimmuns, tels qu'observés chez les patients atteints d'IBD. La même approche fut utilisée dans l'étude de la EAT en relation avec la AIT (115,172). Certaines différences existent entre ces deux maladies, notamment le type de réponse immune impliquée dans chacune d'entre elles, c'est-à-dire, une réponse à médiation cellulaire plus importante au niveau de la EAT qu'au niveau de la AIT. Toutefois, les modèles expérimentaux sont très utiles dans la compréhension et l'explication des processus immunologiques impliqués.

Nos résultats indiquent que l'antigène PI possède un certain degré de spécificité d'espèce. Chez l'humain, peu de

données sont fournies en ce qui concerne les antigènes intestinaux. Le groupe de Nairn (123) a obtenu des anticorps hétérologues spécifiques à un antigène du tractus gastro-intestinal humain. Cet antigène est spécifiquement lié à un organe au niveau de la muqueuse du colon, et les anticorps spécifiques montrent par immunofluorescence, l'existence d'une certaine réactivité croisée avec d'autres espèces. Cependant, cet antigène est aucunement partagé avec les rongeurs. Broberger et collaborateurs (22) ont révélé la présence d'autoantigènes spécifiques du colon dans les IBD, sans posséder de réactivité croisée avec ceux de rat. Contrairement à ce qui précède, d'autres études ont révélé un degré considérable de réactions croisées des autoanticorps humains, dirigés contre l'épithélium intestinal, réagissant également avec celui de rats (93,139, 195,222), et de lapin (220). D'ailleurs, la fréquence à laquelle ces anticorps sont analysés et leur spécificité envers la maladie, dépendent de la source antigénique et du test immunologique utilisés.

Plusieurs études ont démontré la présence d'autoépitopes spécifiques à certains autoanticorps dans des maladies autoimmunes spécifiques d'organes ou systémiques (108,172). Dans l'étude des IBD, des analyses plus approfondies au niveau de la maladie de Crohn (CD), ont révélé la présence de glycoprotéines spécifiques, extraites au niveau du colon et de l'intestin grêle. Par ailleurs, d'autres études soulignent la présence d'autoanticorps spécifiques et la présence d'épitopes communs entre l'organe-cible et d'autres extraits d'organes.

Ces anticorps spécifiques furent identifiés par des protocoles d'absorption à l'aide des extraits de foie et de reins, démontrant des réactions croisées avec les déterminants antigéniques intestinaux (21,25). De plus, certains groupes ont reporté la présence d'autoanticorps chez des patients atteints de UC, réagissant avec des composantes cytoplasmiques au niveau des cellules à mucus (69,95). D'autres groupes ont également analysé les autoantigènes du colon, identifiés spécifiquement à l'aide d'IgG de patients atteints d'IBD, par immunodiffusion, électrophorèse SDS-PAGE, et immunotransfert (181). Finalement, un progrès important sur la caractérisation des antigènes pouvant être spécifiquement impliqués au niveau des IBD a été réalisé. Le groupe de Prindiville (143), a obtenu une banque de mAb dirigés contre de multiples déterminants antigéniques de l'épithélium intestinal humain.

Enfin, l'analyse des mécanismes de contrôle génétique de la réponse immune chez les patients atteints d'IBD, fut effectuée suivant plusieurs paramètres (42). L'étude du contrôle génétique de la réponse immune est une importante avenue dans la recherche expérimentale et clinique des IBD. Nous venons de démontrer la susceptibilité à l'induction de la ECA chez deux souches de souris pures, génétiquement distinctes. Comme il a été mentionné, les gènes de la réponse immune déterminant une telle susceptibilité à répondre, sont localisés fréquemment au niveau d'une sous-région du MHC codant pour les molécules de classe II. Chez l'humain, l'analyse de la susceptibilité génétique, en relation avec le développement de

la maladie, reflète les spéculations expérimentales obtenues chez l'animal. Plusieurs associations ont été effectuées entre les antigènes HLA et la présence de certaines maladies (32,65). Également, certaines associations ont été démontrées entre les IBD et l'antigène B27 (38,196,197). Cependant, d'autres auteurs ne démontrent aucune corrélation des différents phénotypes du HLA avec la présence d'anticorps et l'incidence de la maladie (37). Ceci est un sujet qui mérite d'être approfondi, car certaines relations génétiques ont été reportées au niveau de l'incidence de la maladie dans une même famille (99,173,189).

## CONCLUSION



La possibilité q'un processus autoimmun soit à la base des maladies inflammatoires de l'intestin est jusqu'à maintenant bien soutenue. Plusieurs études ont révélé certaines des caractéristiques immunologiques majeures se reliant à un processus autoimmun, tel une réponse immunitaire hyper-réactive et la présence d'autoanticorps dirigés contre des composantes de la muqueuse intestinale.

La présente recherche tente de caractériser un antigène extrait au niveau de la muqueuse de l'intestin grêle du cobaye et de la souris (PI), capable d'induire une entérocolite autoimmune expérimentale (AEC). L'analyse des épitopes spécifiques d'organe de cet immunogène, selon une approche immunologique et immunochimique, permet de révéler certaines observations se reliant aux caractéristiques d'un syndrome autoimmun spécifique d'organe.

Les résultats obtenus suggèrent l'existence d'épitopes communs entre le PI de cobaye ou de souris et les extraits salins d'organes isologues. L'utilisation de sérums hétérologues anti-PI obtenus chez le lapin, permet d'appuyer ce partage antigénique, démontrant en plus, l'existence d'un faible niveau de déterminants antigéniques communs entre le PI de cobaye et le PI de souris, suggérant une spécificité d'espèce. De plus, la fraction globulinique des sérums hétérologues, des protocoles d'absorptions avec des lyophilisats d'organes isologues, de même que des sérums isologues ou autologues anti-PI, ont permis de démontrer la

présence d'épitopes spécifiques d'organe reliés à l'antigène PI de cobaye ou de souris.

Des sérums isologues obtenus chez le cobaye montrent une réponse plus hétérogène et un titre plus faible d'anticorps anti-PI isologues, tel que révélés par ELISA. L'analyse de la susceptibilité au développement de la AEC et de la synthèse de niveaux plus élevés d'anticorps anti-PI, démontre que les souris BALB/c (H-2<sup>d</sup>) sont plus susceptibles que les souris C57bl/6 (H-2<sup>b</sup>). L'injection d'une seule dose de PI isologue induit une réponse immune marginale, tel que démontrée par ELISA avec les sérums isologues obtenus après 30 jours d'immunisation. Deux doses de PI injectées à 30 jours d'intervalle sont incapables d'augmenter le titre des sérums anti-PI isologues des souris C57bl/6, tel que démontré par ELISA effectué sur des sérums obtenus au jour 60. Toutefois, les souris BALB/c ayant reçu deux doses de l'immunogène, sont apte à synthétiser des niveaux plus élevés d'anticorps anti-PI. Les souris BALB/c autoimmunisées avec deux doses de PI de BALB/c, développent une réponse humorale similaire à celle obtenue chez des souris BALB/c immunisées avec PI de souris CD-1. La réponse humorale des souris est en relation directe avec la dose et le nombre d'injections administrées.

L'analyse par SDS-PAGE du PI de cobaye révèle principalement deux bandes polypeptidiques spécifiques à l'antigène PI. Ces bandes ont des poids moléculaires de 30 et 46 Kd respectivement. L'analyse électrophorétique du PI de souris

BALB/c et CD-1 démontre également deux bandes spécifiques à PI, mais qui possèdent des poids moléculaires de 10 et 8 Kd.

En parallèle à l'analyse par SDS-PAGE, l'incubation du sérum hétérologue anti-PI de cobaye avec PI et les extraits salins de foie et de rein isologues électrotransférés, révèle un bon nombre de bandes partagées entre-eux. Les bandes PI spécifiques sont mieux démontrées par des incubations avec la fraction globulinique du sérum hétérologue anti-PI de cobaye. De plus, des absorptions de l'antisérum avec des lyophilisats de foie et de rein isologues, éliminent les bandes non-spécifiques tout en conservant la spécificité face à l'antigène PI. Des absorptions avec du PI permettent d'éliminer la spécificité de ce dernier. L'analyse immunochimique de PI de cobaye à l'aide des sérums isologues anti-PI, révèle des résultats similaires à ceux obtenus avec l'antisérum hétérologue. Par contre, le nombre de bandes qui possèdent des réactions croisées est moindre. Ainsi, il est possible que ces bandes immunoréactives correspondent à celles identifiées par SDS-PAGE, de poids moléculaires de 30 et 46 Kd.

L'analyse par immunoblotting de PI de souris et des extraits de foie et de rein isologues électrotransférés, incubés avec le sérum hétérologue anti-PI de souris, révèle un certain nombre de bandes partagées entre-eux. Une ou deux bandes semblent être spécifiques à l'antigène PI. Cette observation est confirmée par des absorptions multiples avec des lyophilisats de foie et de rein isologues. Par la suite,

des incubations avec les sérums anti-PI isologues et autologues absorbés ou non, ont permis de montrer l'existence de deux bandes PI-spécifiques, de poids moléculaires d'environ 10 et 8 Kd respectivement.

Les résultats présentés dans cette étude suggèrent que certains déterminants antigéniques sont partagés entre PI et d'autres organes, tandis que d'autres sont uniquement présents au niveau de l'antigène PI et reconnus étant " PI-spécifiques ". Les autoépitopes et les autoanticorps identifiés par les sérums hétérologues, isologues et autologues semblent donc être présents dans notre modèle expérimental de AEC. Toutefois, à l'intérieur des limites accordées par les techniques employées dans cette recherche, l'analyse de ce modèle autoimmun requiert une identification encore plus précise et sophistiquée au niveau de l'implication et de la structure des autoépitopes pour lesquels des autoanticorps sont dirigés. L'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre ces autoépitopes, donnera un meilleur aperçu des déterminants antigéniques impliqués. De plus, l'utilisation d'anticorps anti-idiotypes serait un atout au niveau de la caractérisation des autoépitopes qui peuvent être spécifiquement impliqués dans les modèles expérimentaux de maladies autoimmunes. Ces analyses pourraient fournir ainsi, des résultats importants au niveau de l'origine, l'activité et la compréhension des mécanismes immunologiques à la base des processus immunopathologique, conduisant vers des interventions cibles dans ces maladies autoimmunes expérimentales.

L'utilité des modèles expérimentaux dans la compréhension des maladies autoimmunes humaines, est considérablement bien établi au niveau de certaines maladies autoimmunes, tel la thyroïdite autoimmune, l'orchite autoimmune, la myasthénie gravis et le lupus érythémateux systémique. Quoiqu'une relation entre l'entérocolite autoimmune expérimentale et les maladies inflammatoires de l'intestin nécessite d'être définitivement établie, nous croyons que le modèle d'entérocolite autoimmune présenté ici, aidera à une meilleur compréhension des caractéristiques immunologiques des maladies inflammatoires de l'intestin humain.

**FIGURES**

**Figures 1 et 2 :** Profil chromatographique de la fraction microsomale des grattages de la muqueuse d'intestin grêle sur une colonne de Séphacryl S-200 superfine de 2.6 x 100 cm.

Les lyophilisats d'extraits bruts de muqueuse d'intestin grêle de cobaye Hartley et de souris CD-1, obtenus par la technique de grattage (scraping), sont dissous dans de l'eau distillée et déposés sur un gel de Séphacryl S-200 superfine. Le premier pic sortant après le volume exclu (Pool 3) est utilisé sous le nom d'antigène PI.

Figure 1: Profil chromatographique de l'extrait brut de cobaye Hartley.

V.E.: Volume exclu de la colonne.

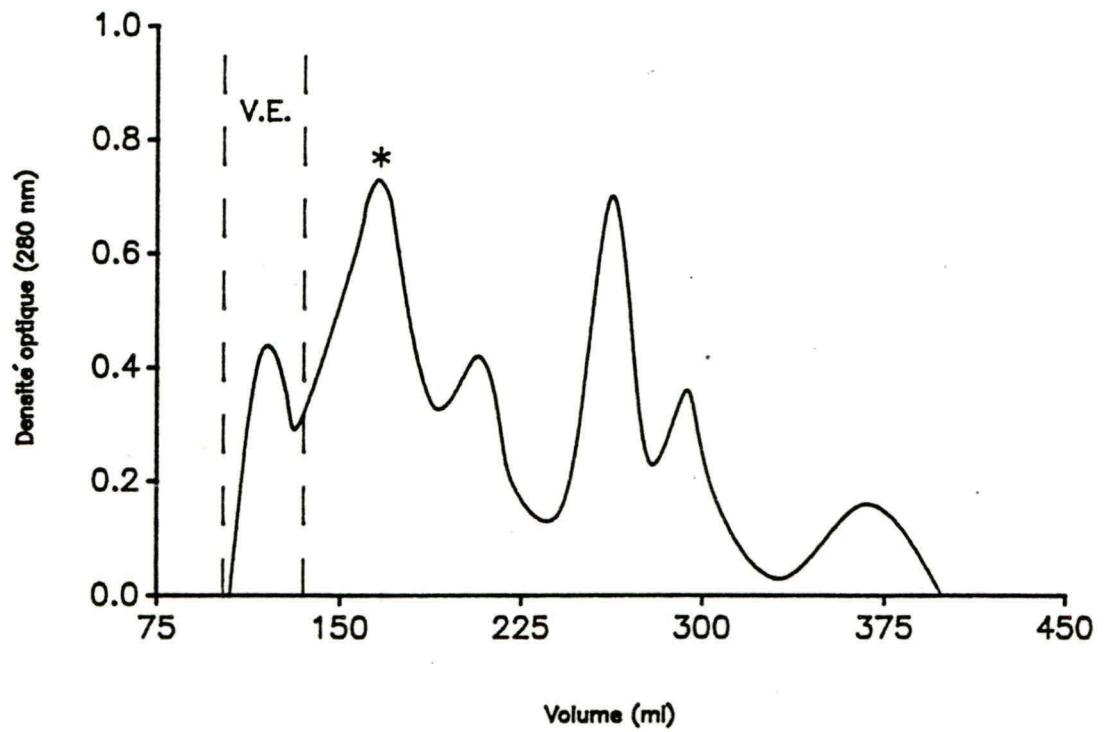
\* : Pool 3 (PI de cobaye Hartley).

Figure 2: Profil chromatographique de l'extrait brut de souris CD-1.

V.E.: Volume exclu de la colonne.

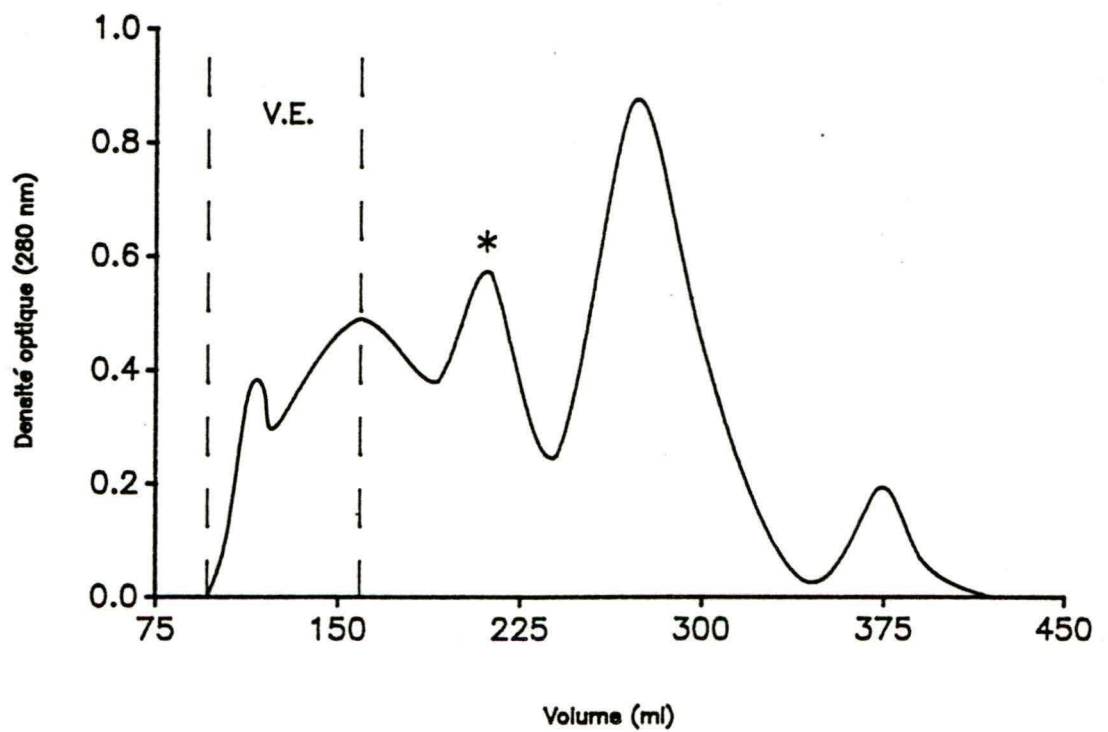
\* : Pool 3 (PI de souris CD-1).

### Extrait de cobaye Hartley



1

### Extrait de souris CD-1



2



**Figure 3 : Analyse électrophorétique de PI de cobaye Hartley et des extraits salins de foie et de rein isologues par SDS-PAGE.**

En utilisant un gel de polyacrylamide en gradient de 5 à 15 %, les échantillons de foie, de rein et de PI de cobaye Hartley, à des concentrations protéiniques de 40 µgN, sont séparées par électrophorèse SDS-PAGE. Les multiples bandes polypeptidiques sont colorées à l'aide d'une solution de bleu de Coomassie 0.1 %. Le poids moléculaire respectif de chacune de celles-ci est déterminé à l'aide de standards de poids moléculaires variant de 14.3 à 46.0 Kd.

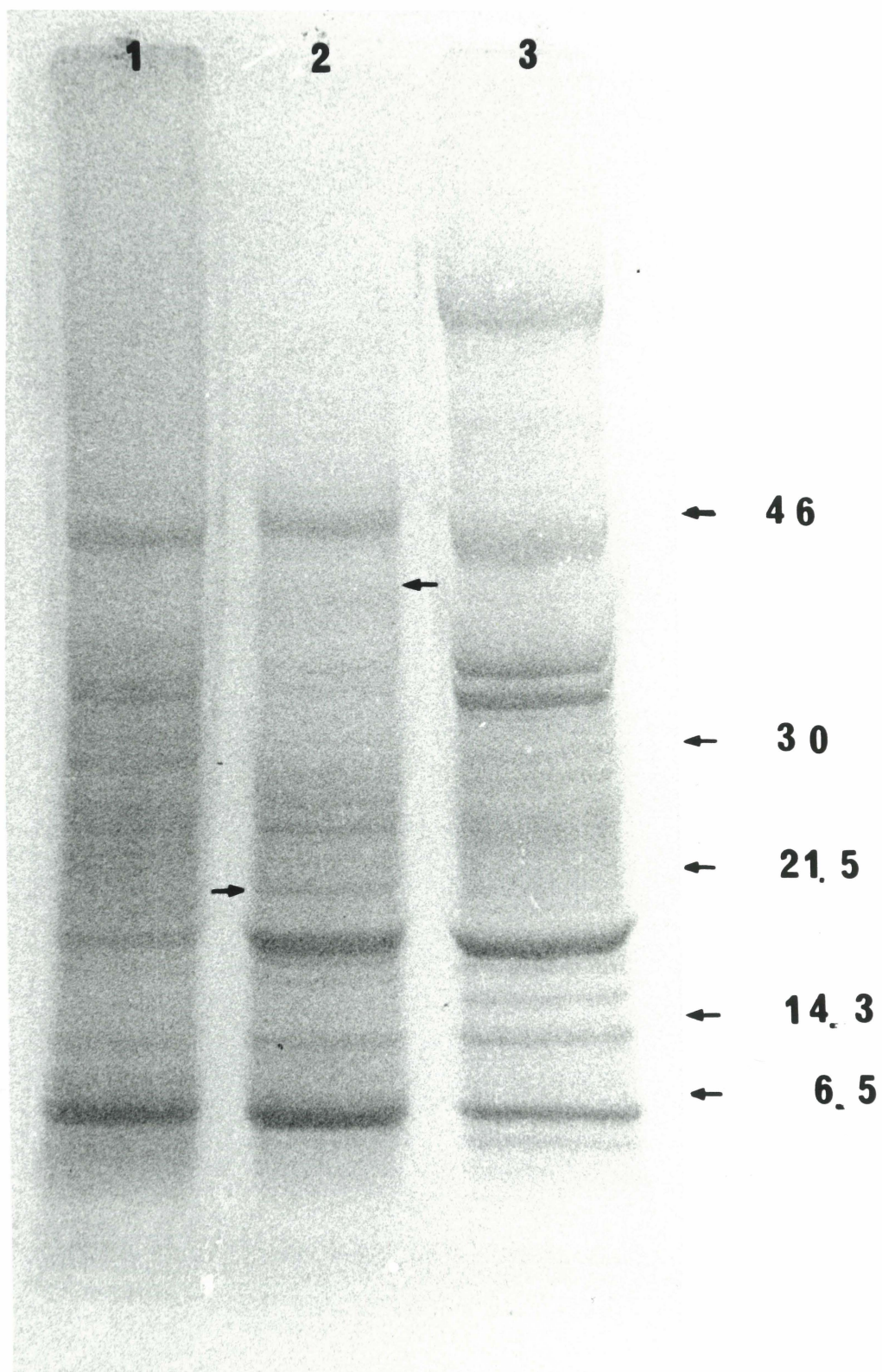
**Légende:**

1 : Extrait salin de rein isologue.

2 : PI de cobaye Hartley.

3 : Extrait salin de foie isologue.

➡ : Bandes polypeptidiques spécifiques à PI.



**Figure 4 : Analyse électrophorétique de PI de souris CD-1 et d'extraits salins d'organes isologues par SDS-PAGE.**

En utilisant un gel de polyacrylamide en gradient de 5 à 15 %, les échantillons de foie, de rein et de PI de souris, à des concentrations protéiniques de 75 µgN, sont séparés par électrophorèse SDS-PAGE. Les multiples bandes polypeptidiques sont colorées avec une solution de bleu de Coomassie 0.1 %. Le poids moléculaire respectif de chacune de celles-ci, est déterminé à l'aide de standards de poids moléculaires.

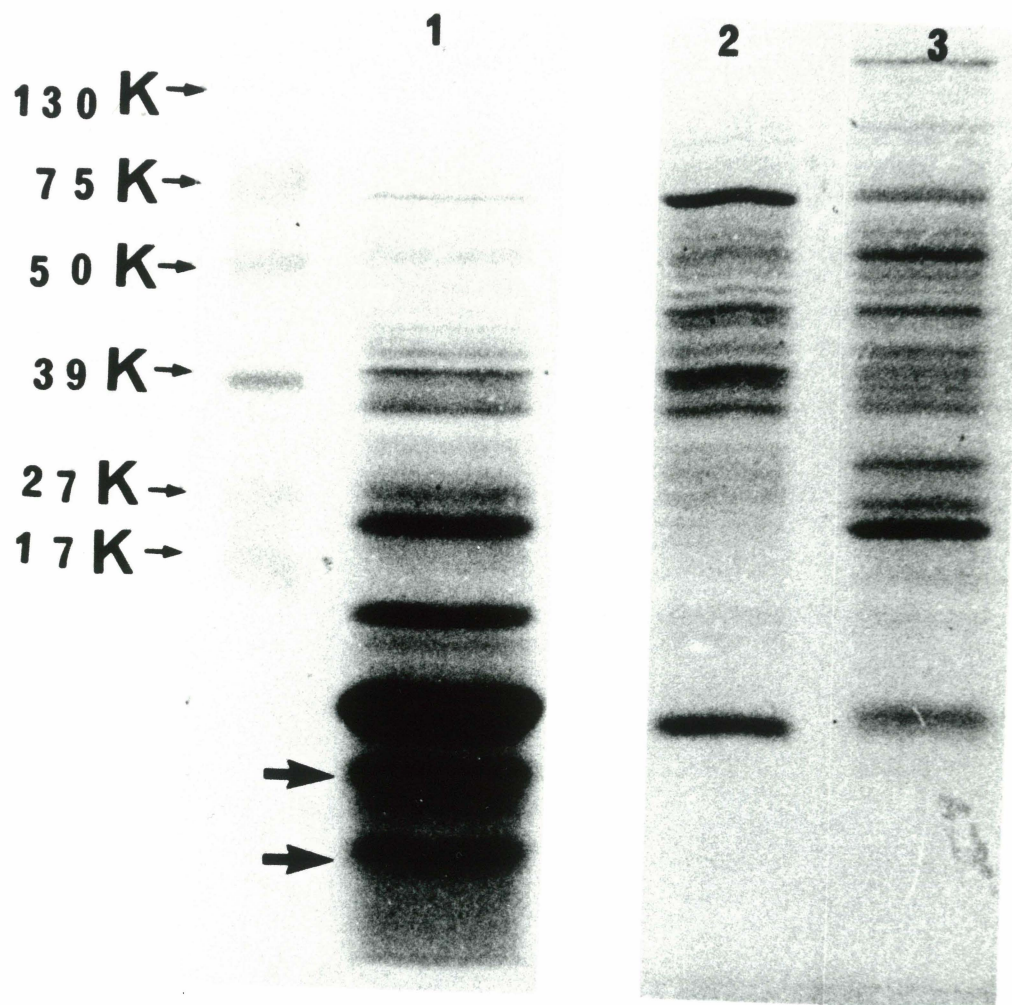
**Légende:**

1 : PI de souris CD-1.

2 : Extrait salin de rein de souris CD-1.

3 : Extrait salin de foie de souris CD-1.

➡ : Bandes polypeptidiques spécifiques à PI.



**Figure 5 : Dosage immunoenzymatique mesuré par ELISA, du sérum hétérologue anti-PI de cobaye incubé avec du PI isologue et xénogénique (souris CD-1).**

Lecture à 450 nm.

Légende:

○ : Sérum hétérologue anti-PI de cobaye Hartley, dilué à 1/5000 et incubé avec du PI de cobaye Hartley.

□ : Sérum pré-immun, dilué à 1/5000.

◇ : Sérum hétérologue anti-PI de cobaye Hartley, dilué à 1/5000 et incubé avec du PI de souris CD-1.

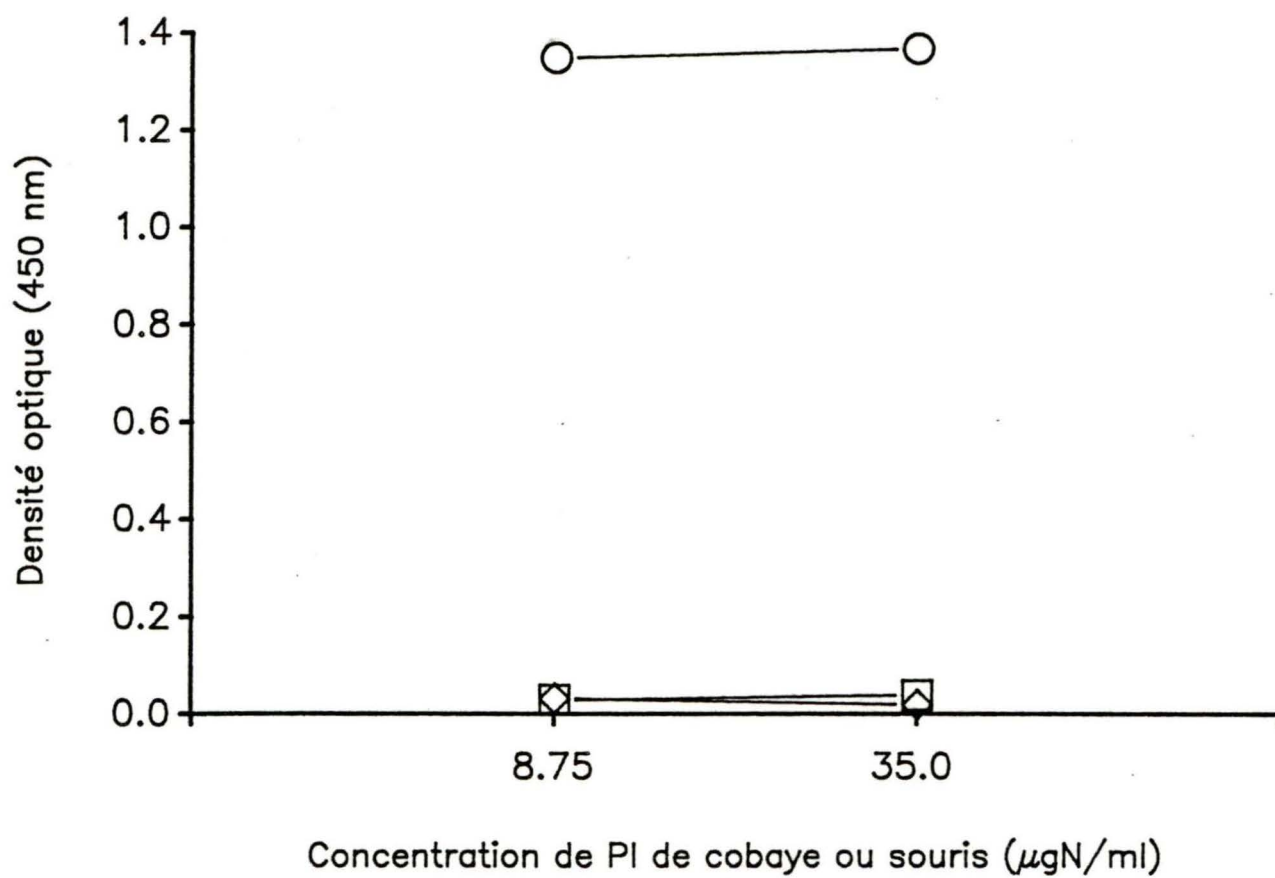


Figure 6 : Dosage immunoenzymatique mesuré par ELISA, du  
sérum hétérologue anti-PI de souris incubé avec du PI  
isologue (CD-1) et xénogénique (cobaye).

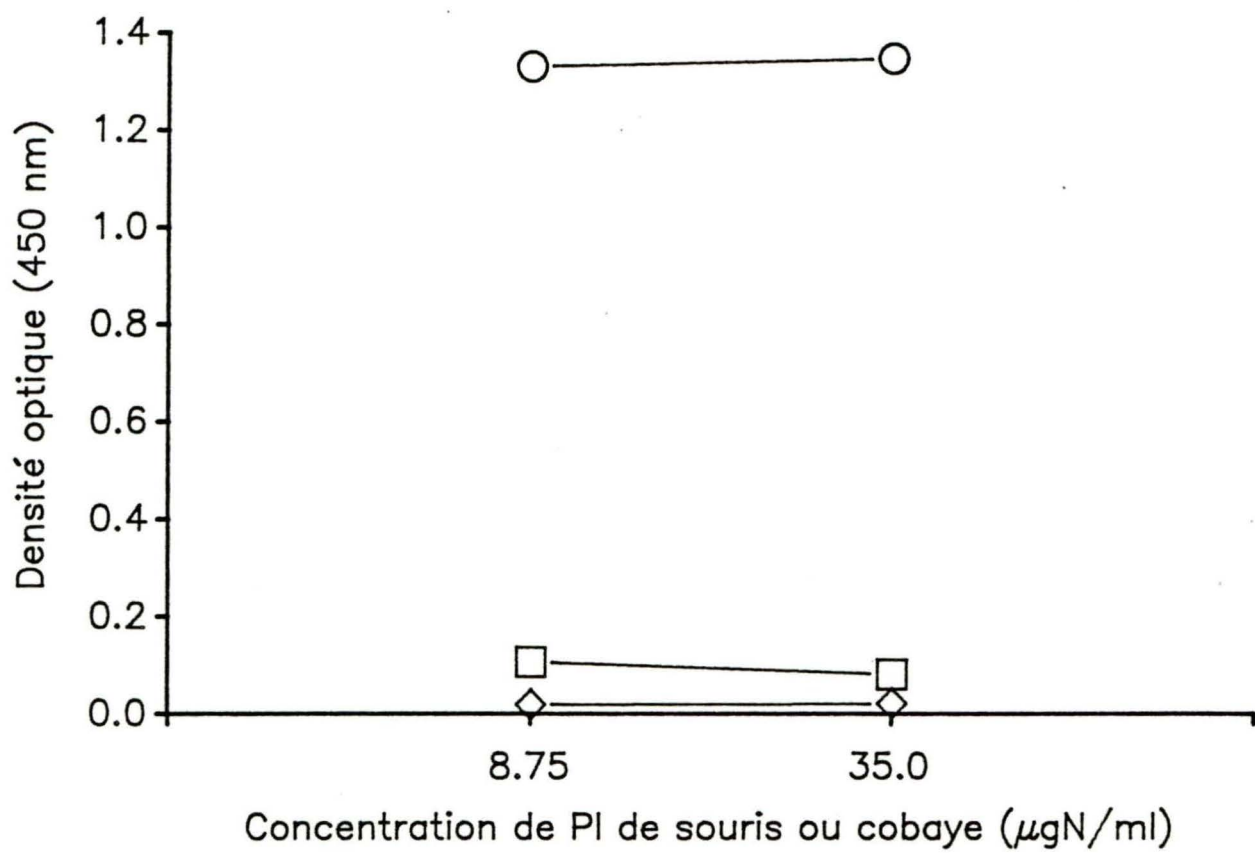
Lecture à 450 nm.

Légende:

○ : Sérum hétérologue anti-PI de souris CD-1, dilué  
à 1/1000 et incubé avec du PI de souris CD-1.

□ : Sérum pré-immun, dilué à 1/1000.

◇ : Sérum hétérologue anti-PI de souris CD-1, dilué  
à 1/1000 et incubé avec du PI de cobaye Hartley.





**Figure 7 : Analyse immunoenzymatique mesurée par ELISA, des réactions croisées entre le PI de cobaye Hartley et les extraits salins d'organes isologues.**

Lecture à 450 nm.

Légende:

○ : Sérum hétérologue anti-PI de cobaye, dilué à 1/5000 et incubé avec du PI de cobaye Hartley.

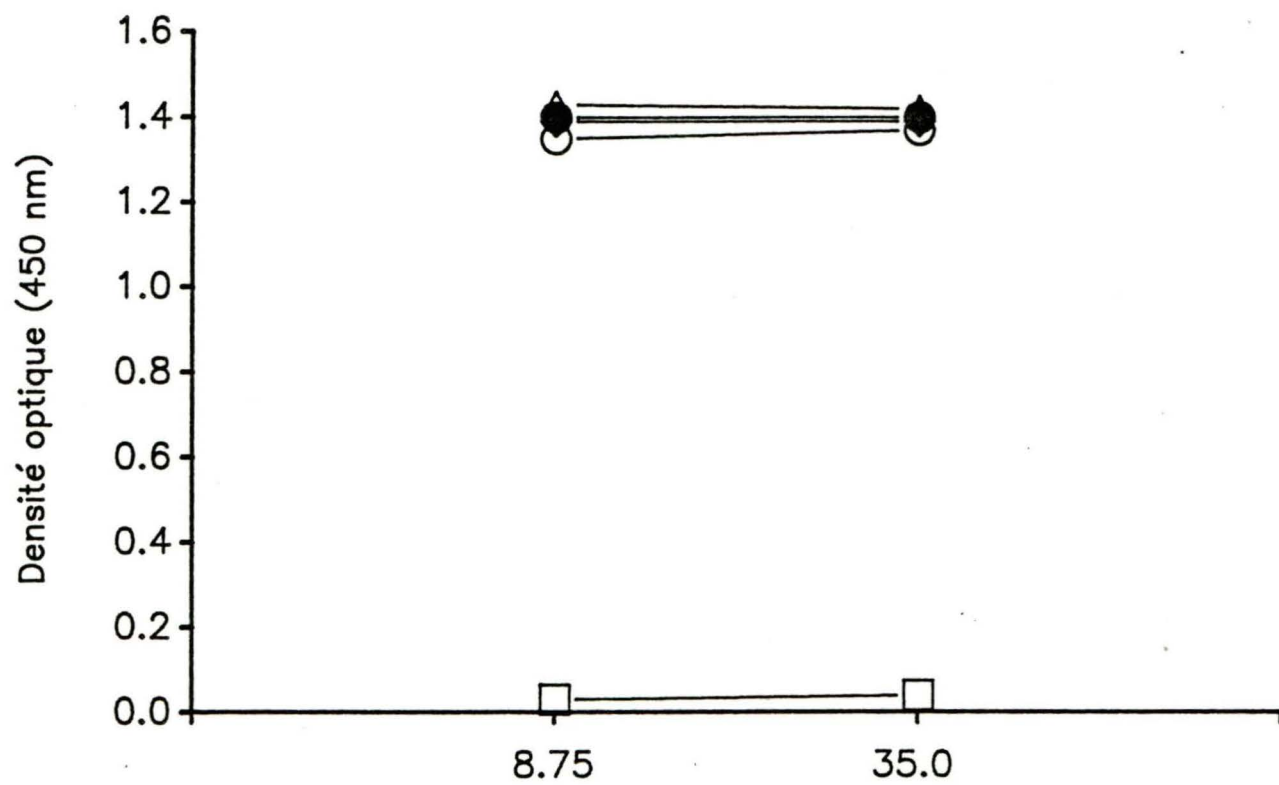
● : Sérum hétérologue anti-PI de cobaye, dilué à 1/5000 et incubé avec l'extrait salin de foie isologue.

△ : Sérum hétérologue anti-PI de cobaye, dilué à 1/5000 et incubé avec l'extrait salin de rein isologue.

◇ : Sérum hétérologue anti-PI de cobaye, dilué à 1/5000 et incubé avec l'extrait salin de testicule isologue.

□ : Sérum pré-immun, dilué à 1/5000 et incubé avec du PI, du foie, du rein et testicule de cobaye Hartley.

Moyenne des valeurs obtenues.



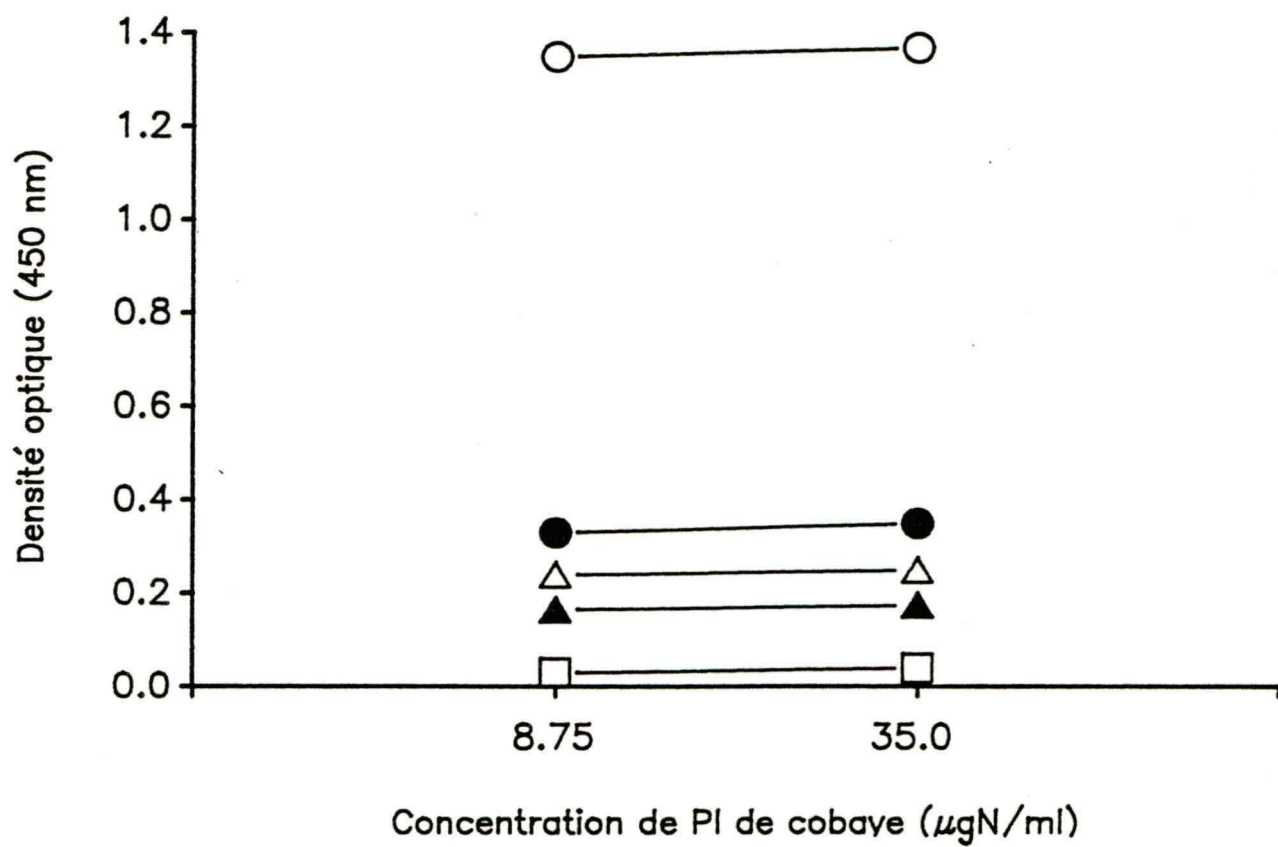
Concentration de PI et extraits d'organes de cobaye ( $\mu\text{gN/ml}$ )

**Figure 8 : Analyse immunoenzymatique mesurée par ELISA, du sérum hétérologue anti-PI de cobaye, absorbé avec des lyophilisats de foie, de rein et de PI isologue.**

Lecture à 450 nm.

Légende:

- : Sérum hétérologue anti-PI de cobaye, dilué à 1/5000 et incubé avec du PI de cobaye Hartley.
- : Sérum hétérologue anti-PI de cobaye absorbé 4 x avec du foie isologue, dilué à 1/5000 et incubé avec du PI de cobaye Hartley.
- △ : Sérum hétérologue anti-PI de cobaye absorbé 4 x avec du rein isologue, dilué à 1/5000 et incubé avec du PI de cobaye Hartley.
- ▲ : Sérum hétérologue anti-PI de cobaye absorbé 4 x avec du PI isologue, dilué à 1/5000 et incubé avec du PI de cobaye Hartley.
- : Sérum pré-immun, dilué à 1/5000 et incubé avec du PI de cobaye Hartley.



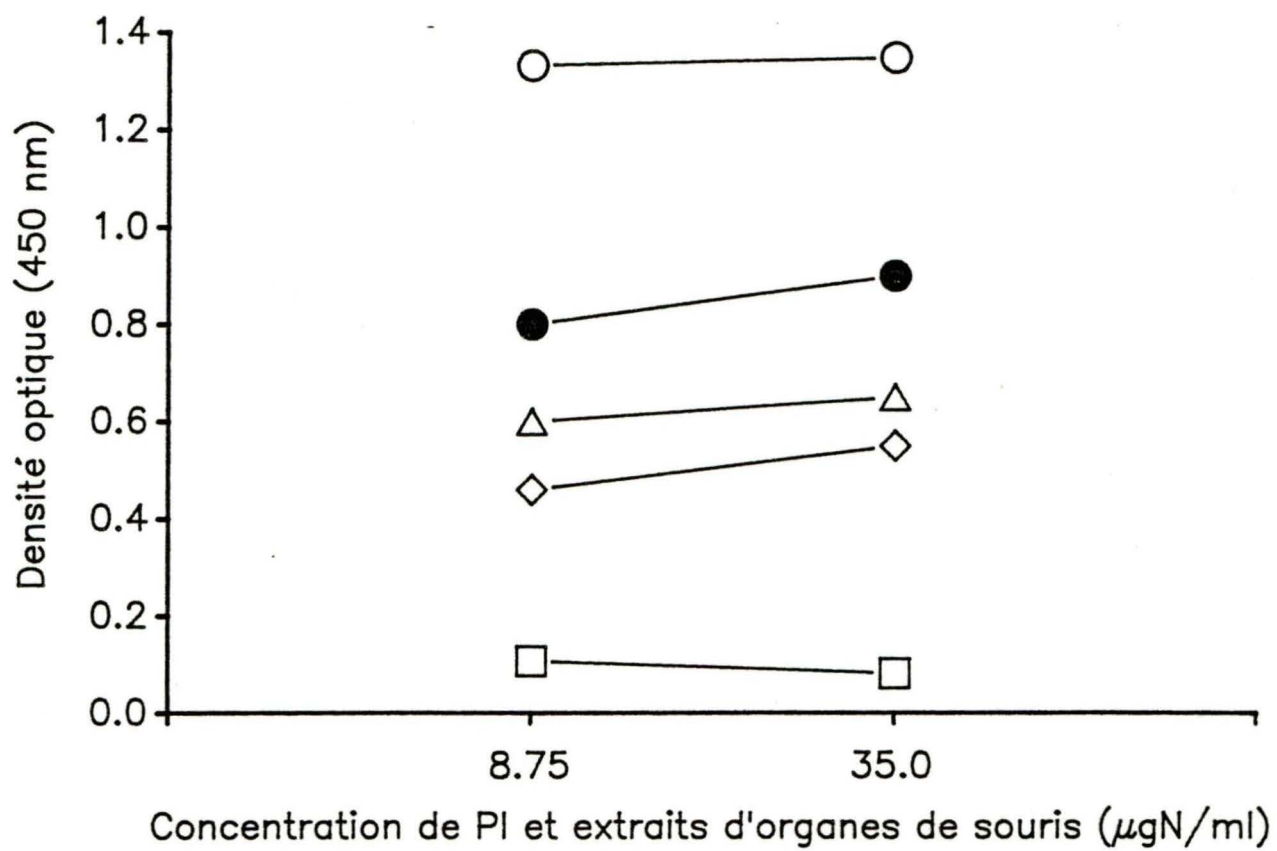
**Figure 9 :** Analyse immunoenzymatique mesurée par ELISA, des réactions croisées entre le PI de souris CD-1 et les extraits salins d'organes isologues.

Lecture à 450 nm.

Légende:

- : Sérum hétérologue anti-PI de souris, dilué à 1/1000 et incubé avec du PI de souris CD-1.
- : Sérum hétérologue anti-PI de souris, dilué à 1/1000 et incubé avec l'extrait salin de foie isologue.
- △ : Sérum hétérologue anti-PI de souris, dilué à 1/1000 et incubé avec l'extrait salin de rein isologue.
- ◇ : Sérum hétérologue anti-PI de souris, dilué à 1/1000 et incubé avec l'extrait salin de testicule isologue.
- : Sérum pré-immun, dilué à 1/1000 et incubé avec du PI, du rein, du foie et testicules de souris CD-1.

Moyenne des valeurs obtenues.

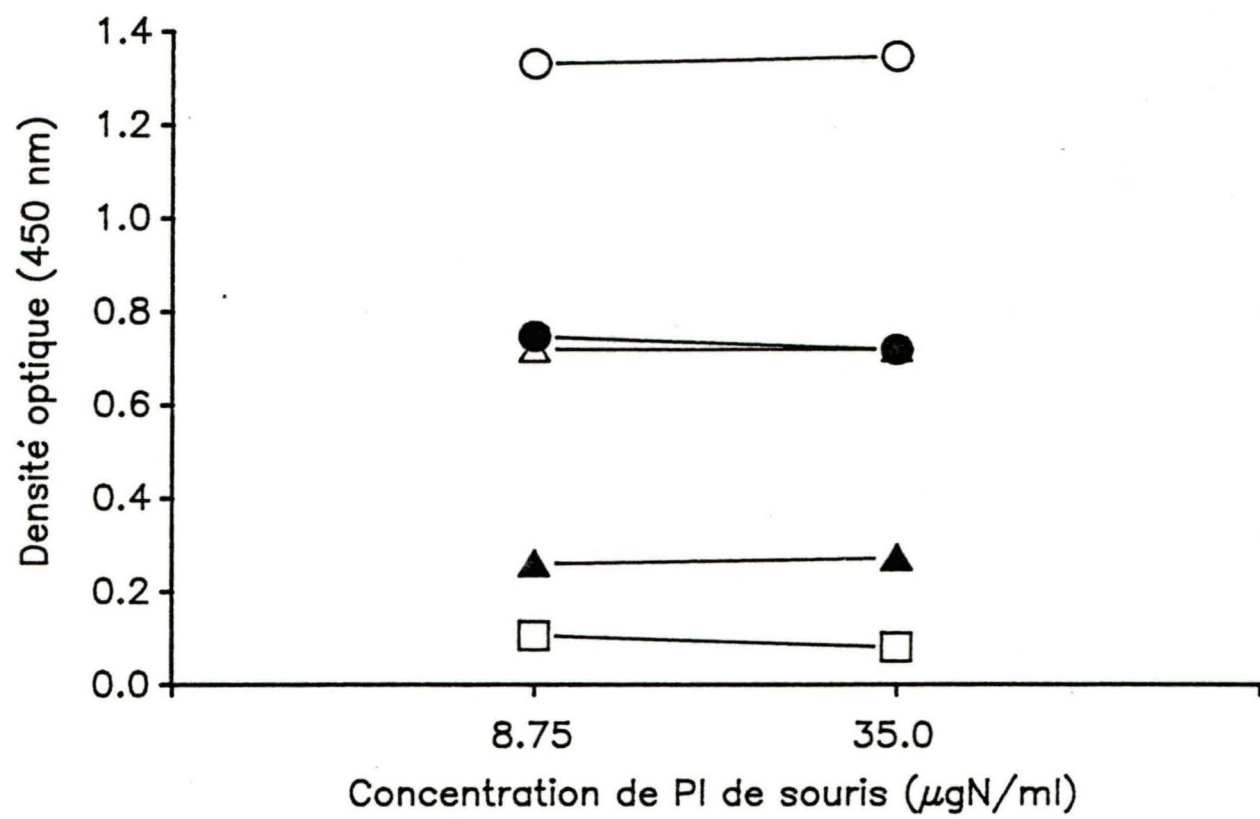


**Figure 10 : Analyse immunoenzymatique mesurée par ELISA, du sérum hétérologue anti-PI de souris, absorbé avec des lyophilisats de foie, de rein et de PI isologues.**

Lecture à 450 nm.

Légende:

- : Sérum hétérologue anti-PI de souris, dilué à 1/1000 et incubé avec du PI de souris CD-1.
- : Sérum hétérologue anti-PI de souris absorbé 4 x avec du foie isologue, dilué à 1/1000 et incubé avec du PI de souris CD-1.
- △ : Sérum hétérologue anti-PI de souris absorbé 4 x avec du rein isologue, dilué à 1/1000 et incubé avec du PI de souris CD-1.
- ▲ : Sérum hétérologue anti-PI de souris absorbé 4 x avec du PI isologue, dilué à 1/1000 et incubé avec du PI de souris CD-1.
- : Sérum pré-immun, diluée à 1/1000 et incubée avec du PI de souris CD-1.



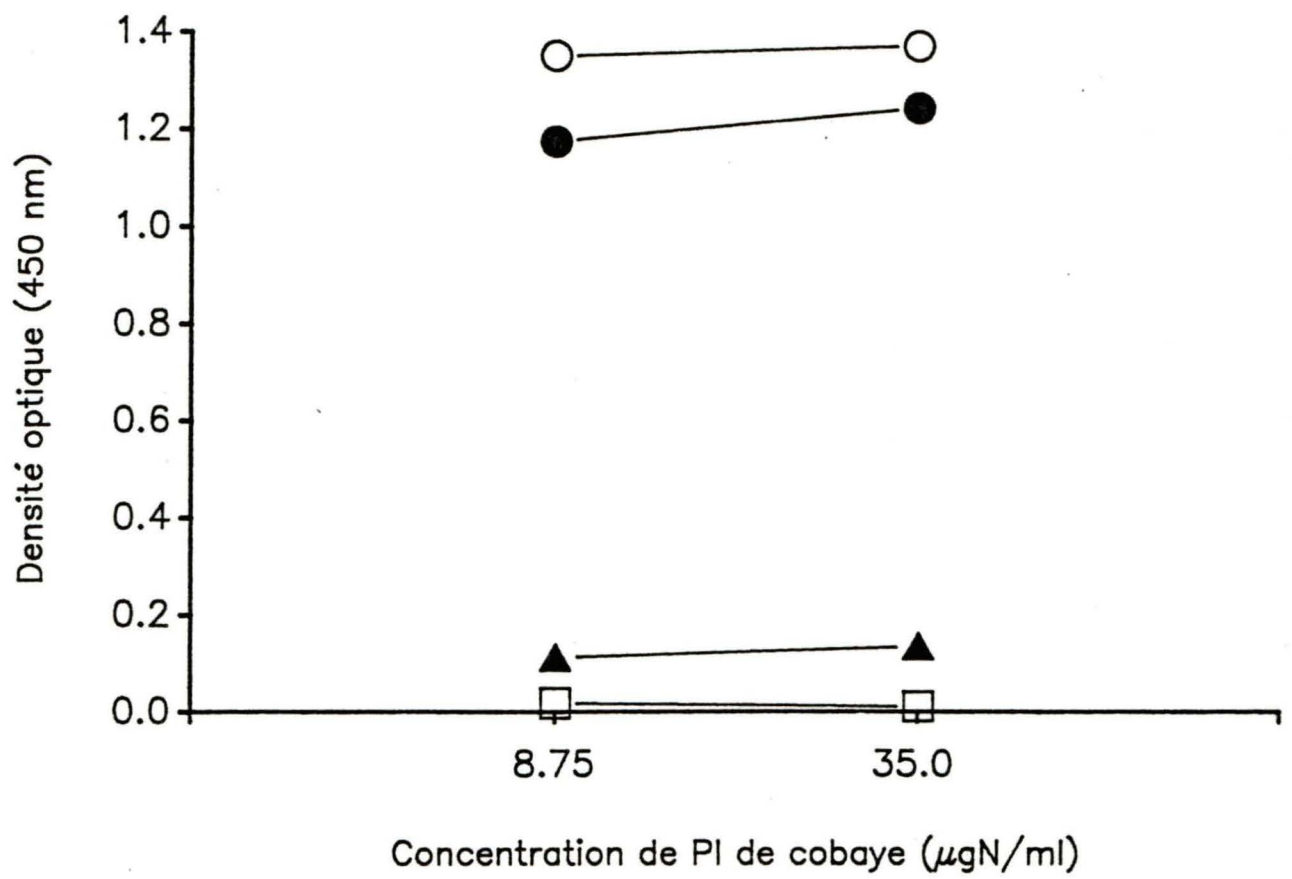


**Figure 11 : Analyse immunoenzymatique mesurée par ELISA, de la fraction globulinique du sérum hétérologue anti-PI de cobaye incubée avec du PI isologue.**

Lecture à 450 nm.

Légende:

- : Sérum hétérologue anti-PI de cobaye, dilué à 1/5000 et incubé avec du PI de cobaye Hartley.
- : Fraction globulinique du sérum hétérologue anti-PI de cobaye, diluée à 1/5000 et incubée avec du PI de cobaye Hartley.
- ▲ : Fraction non-globulinique du sérum hétérologue anti-PI de cobaye, diluée à 1/5000 et incubée avec du PI de cobaye Hartley.
- : Sérum pré-immun, dilué à 1/5000 et incubé avec du PI de cobaye Hartley.

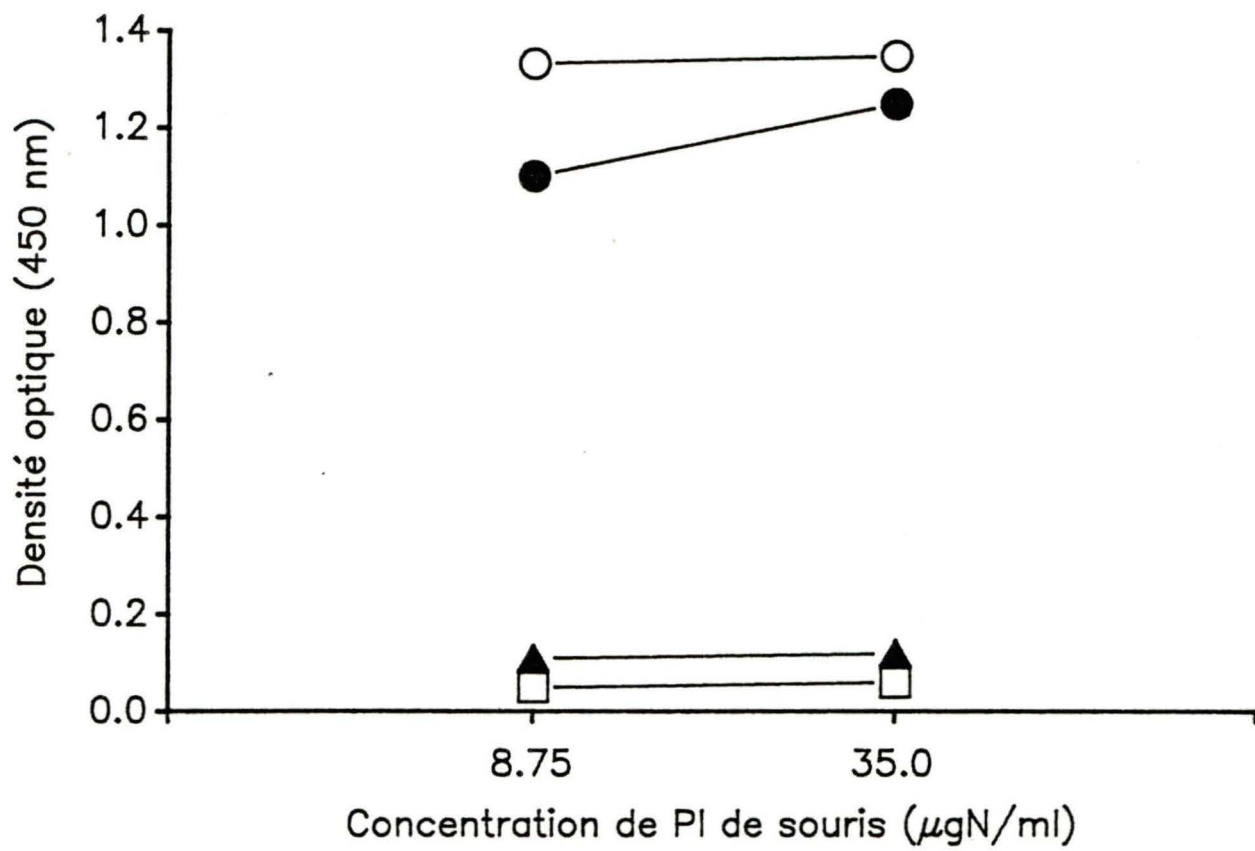


**Figure 12 :** Analyse immunoenzymatique mesurée par ELISA, de la fraction globulinique du sérum hétérologue anti-PI de souris incubée avec du PI isologue.

Lecture à 450 nm.

Légende:

- : Sérum hétérologue anti-PI de souris, dilué à 1/1000 et incubé avec du PI de souris CD-1.
- : Fraction globulinique du sérum hétérologue anti-PI de souris, diluée à 1/1000 et incubée avec du PI de souris CD-1.
- ▲ : Fraction non-globulinique du sérum hétérologue anti-PI de souris, diluée à 1/1000 et incubée avec du PI de souris CD-1.
- : Sérum pré-immun, dilué à 1/1000 et incubé avec du PI de souris CD-1.

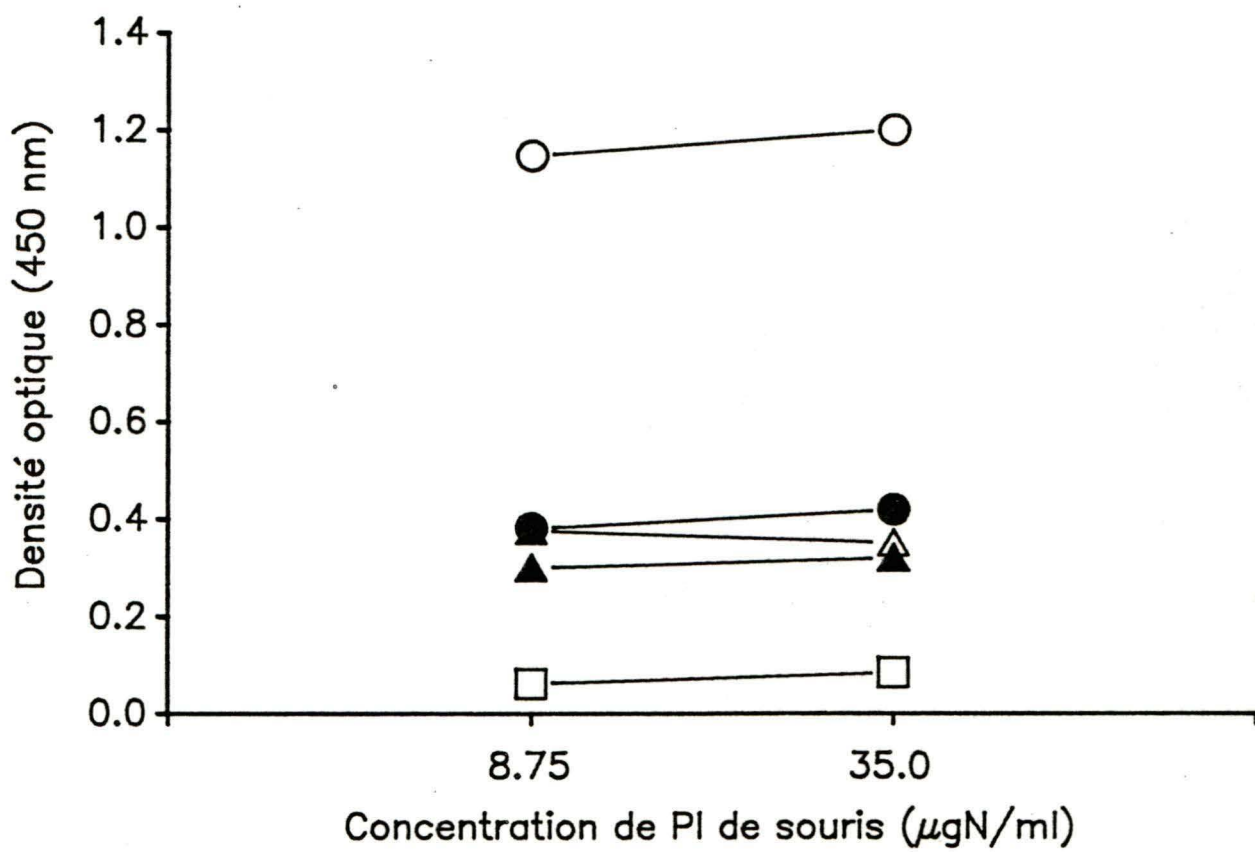


**Figure 13 : Analyse immunoenzymatique mesurée par ELISA, de la fraction globulinique du sérum hétérologue anti-PI de souris absorbée avec des lyophilisats de foie, de rein et de PI isologues.**

Lecture à 450 nm.

Légende:

- : Fraction globulinique anti-PI de souris, diluée à 1/1000 et incubée avec du PI de souris CD-1.
- : Fraction globulinique anti-PI de souris absorbée 4 x avec du foie isologue, diluée à 1/1000 et incubée avec du PI de souris CD-1.
- △ : Fraction globulinique anti-PI de souris absorbée 4 x avec du rein isologue, diluée à 1/1000 et incubée avec du PI de souris CD-1.
- ▲ : Fraction globulinique anti-PI de souris absorbée 4 x avec du PI isologue, diluée à 1/1000 et incubée avec du PI de souris CD-1.
- : Fraction globulinique du sérum pré-immun, diluée à 1/1000 et incubée avec du PI de souris CD-1.



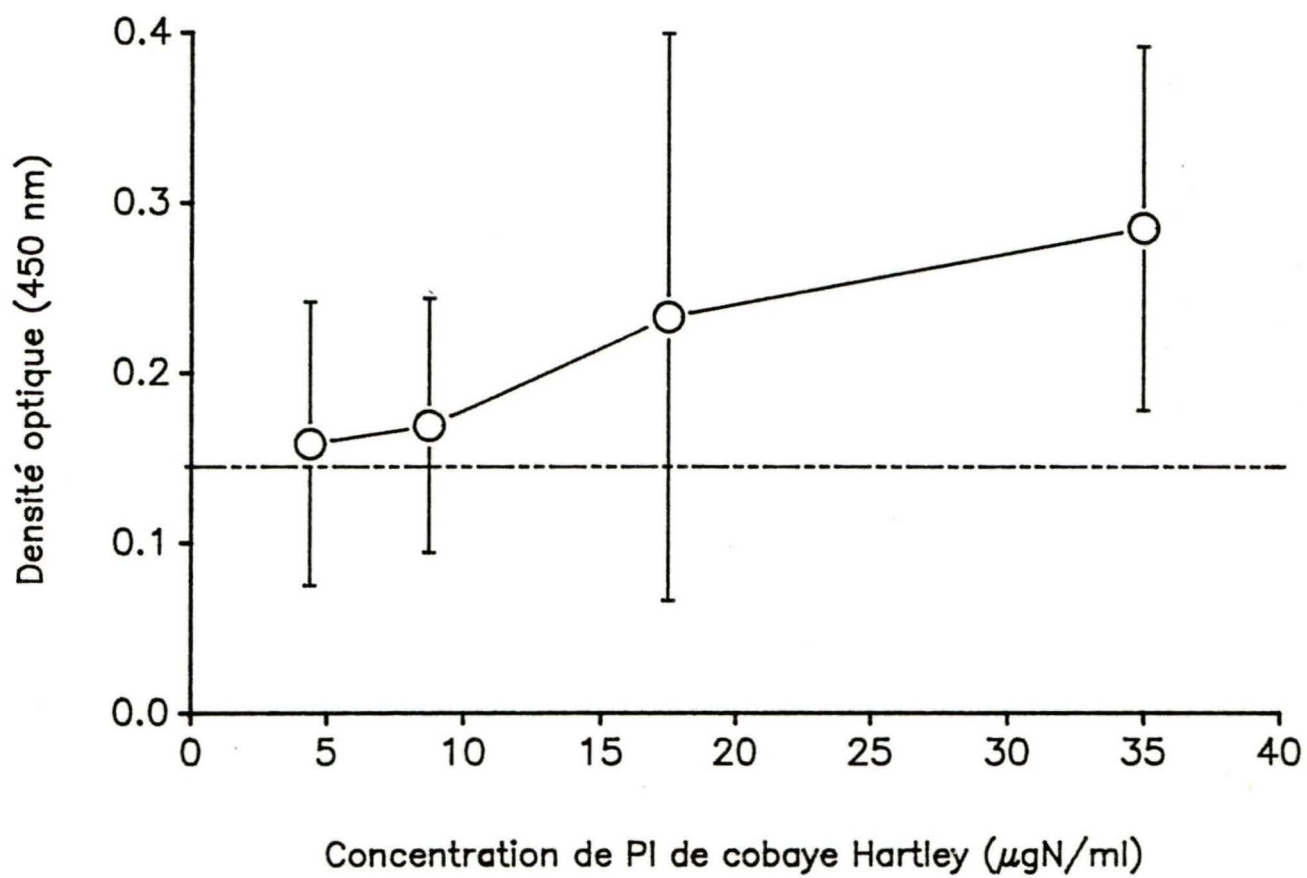
**Figure 14 : Analyse immunoenzymatique mesurée par ELISA, des sérums isologues de cobaye Hartley ayant reçu trois doses de PI isologue.**

Lecture à 450 nm.

Légende:

○ : Sérums isologues anti-PI de cobaye ayant reçu trois doses de 5 mgN/ACF, dilués à 1/100 et incubés avec du PI de cobaye isologue. n = 5.

---- : Moyenne des sérums témoins + 2 x D.S., dilués à 1/100 et incubés avec du PI de cobaye isologue.





**Figures 15 et 16 :** Analyse immunoenzymatique mesurée par ELISA, des sérums des souris BALB/c et C57bl/6 ayant reçu une seule dose de PI de souris CD-1.

Lecture à 450 nm.

Légende:

Fig.15: Souris BALB/c. Fig.16: Souris C57bl/6.

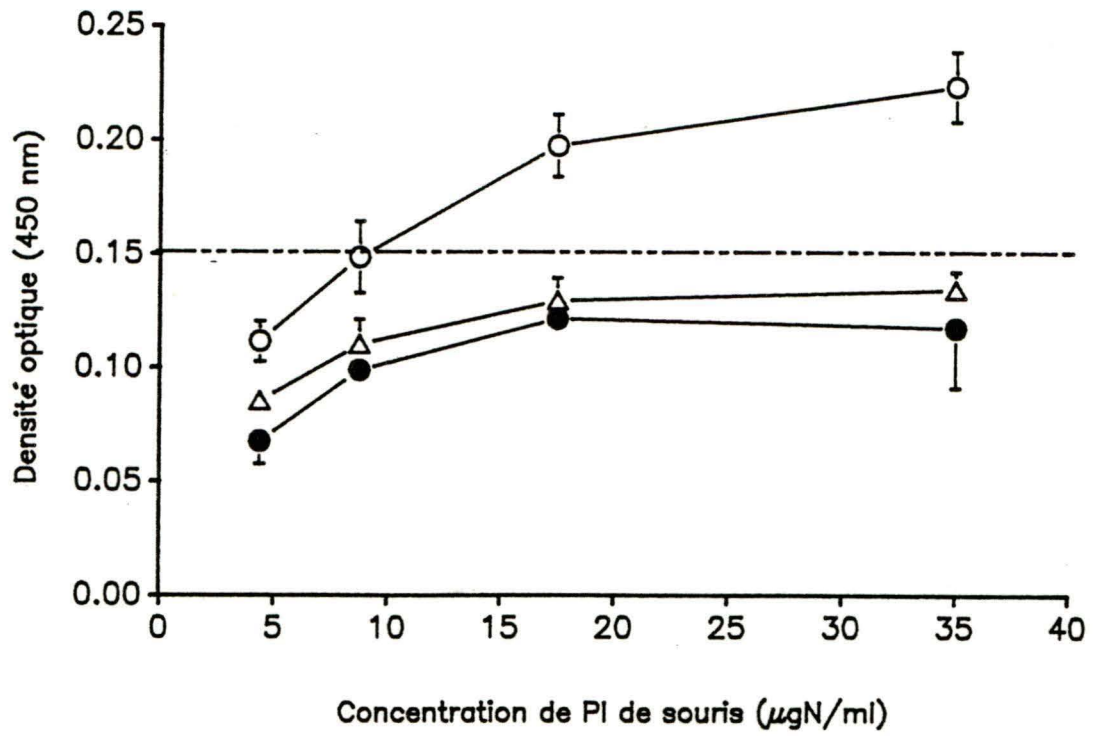
○ : Sérums isologues anti-PI de souris ayant reçu une dose de 1000 µgN/ACF, dilués à 1/100 et incubés avec du PI de souris CD-1. n = 3.

△ : Sérums isologues anti-PI de souris ayant reçu une dose de 500 µgN/ACF, dilués à 1/100 et incubés avec du PI de souris CD-1. n = 3.

● : Sérums isologues anti-PI de souris ayant reçu une dose de 250 µgN/ACF, dilués à 1/100 et incubés avec du PI de souris CD-1. n = 3.

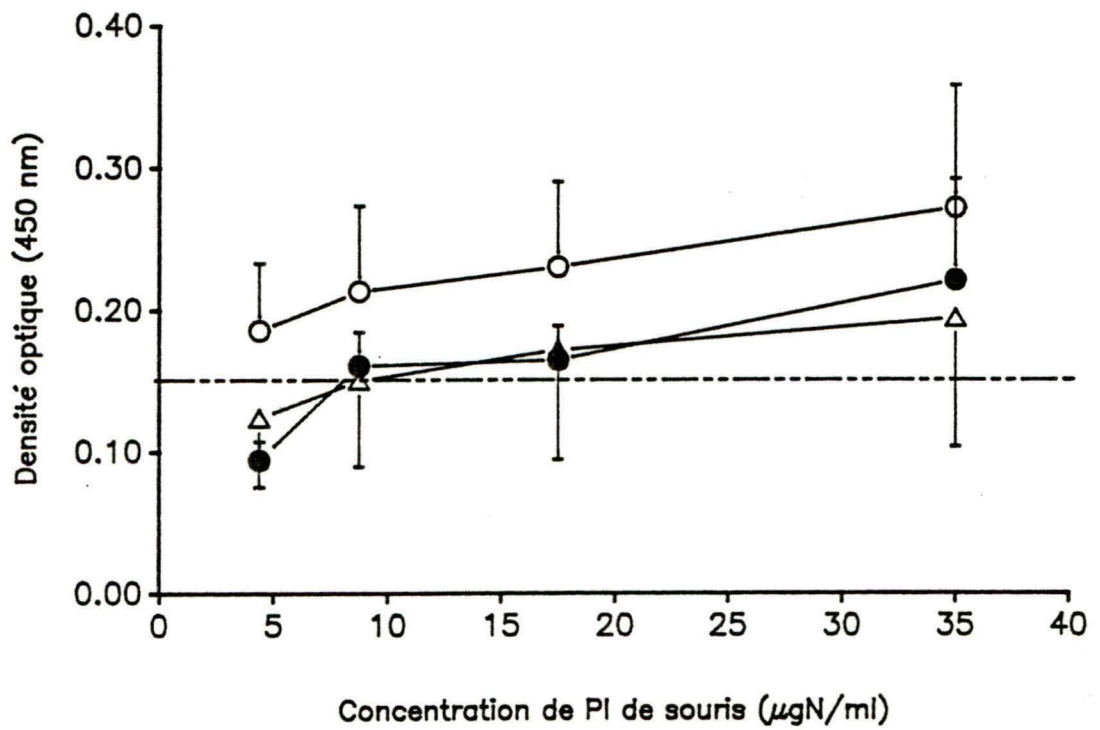
---- : Moyenne des sérums témoins + 2 x D.S., dilués à 1/100 et incubés avec du PI de souris CD-1.

# Souris Balb/c



15

# Souris C57bl/6



16

**Figures 17 et 18 :** Analyse immunoenzymatique mesurée par ELISA, des sérums des souris BALB/c et C57bl/6 ayant reçu deux doses de PI de souris CD-1.

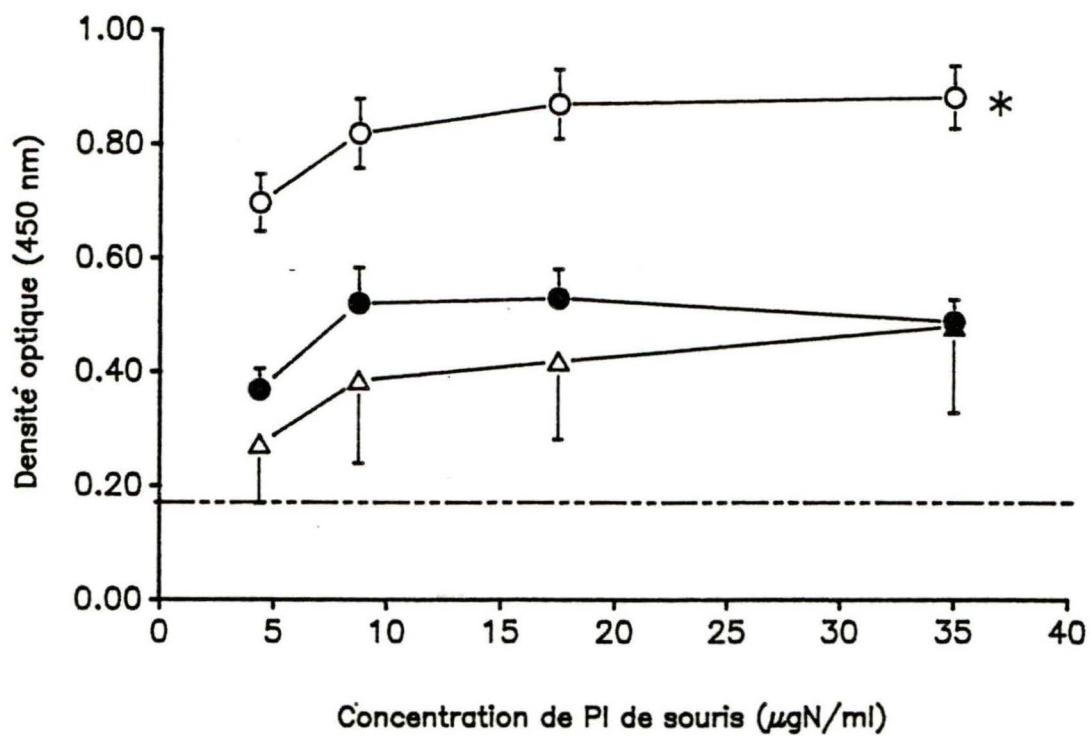
Lecture à 450 nm.

Legende:

Fig.17: Souris BALB/c. Fig.18: Souris C57bl/6.

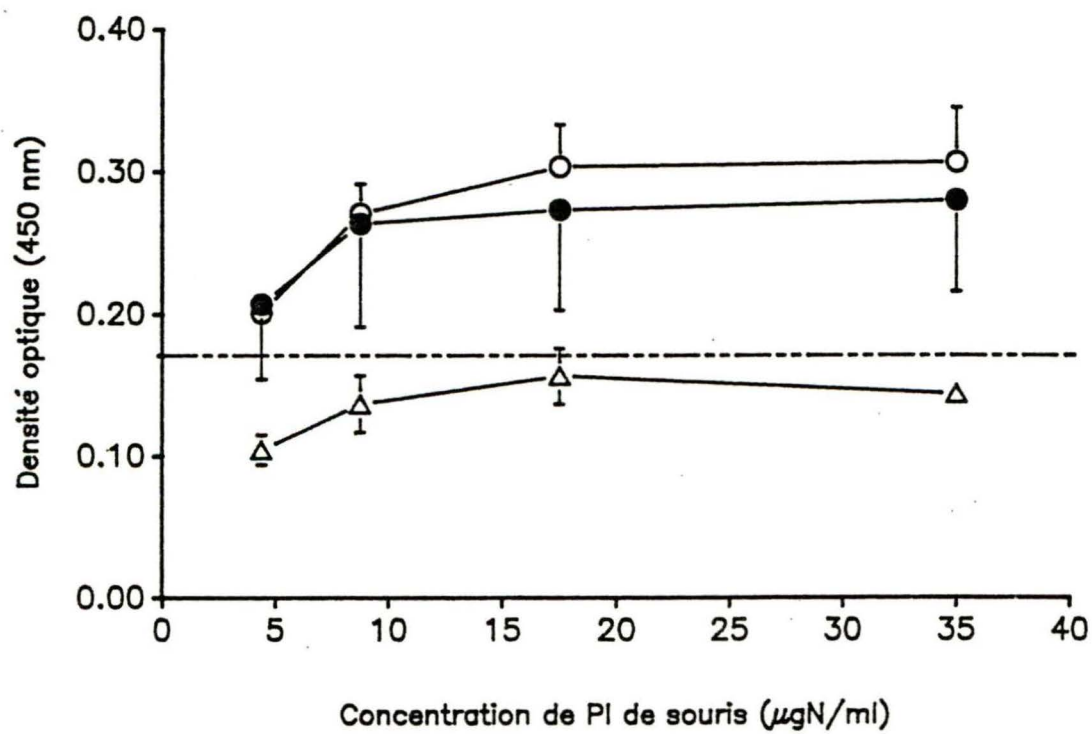
- : Sérums isologues anti-PI de souris ayant reçu deux doses de 1000 µgN/ACF, dilués à 1/100 et incubés avec du PI de souris CD-1. \*: n = 13.
- : Sérums isologues anti-PI de souris ayant reçu deux doses de 500 µgN/ACF, dilués à 1/100 et incubés avec du PI de souris CD-1. n = 3.
- △ : Sérums isologues anti-PI de souris ayant reçu deux doses de 250 µgN/ACF, dilués à 1/100 et incubés avec du PI de souris CD-1. n = 3.
- : Moyenne des sérums témoins + 2 x D.S., dilués à 1/100 et incubés avec du PI de souris CD-1.

Souris Balb/c



17

Souris C57bl/6



18

**Figure 19 : Analyse statistique par le test t, de la réponse humorale mesurée par ELISA, des souris BALB/c et C57bl/6 ayant reçu une ou deux doses de PI de souris CD-1.**

Lecture à 450 nm.

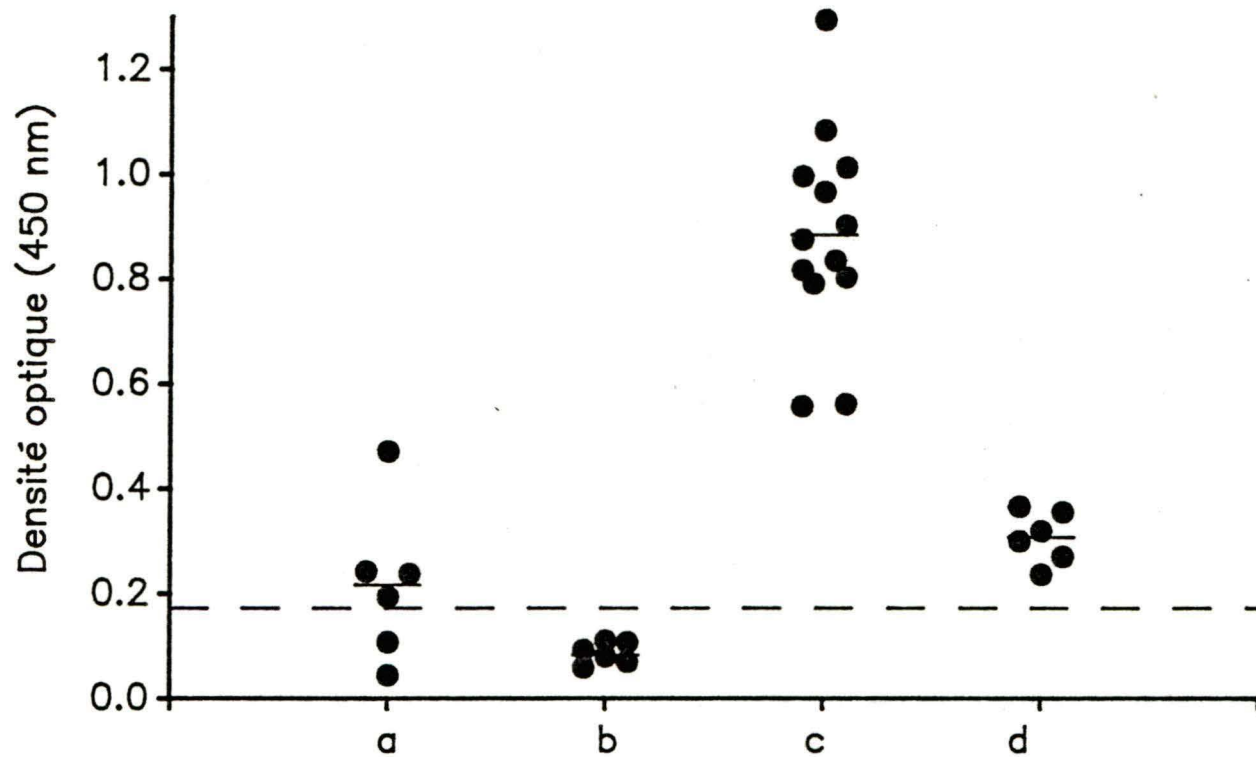
Légende:

a et c : Sérums isologues des souris BALB/c ayant reçu une (a) et deux (c) doses de PI à 1000 µgN/ACF, dilués à 1/100 et incubés avec du PI de souris CD-1.

b et d : Sérums isologues des souris C57bl/6 ayant reçu une (b) et deux (d) doses de PI à 1000 µgN/ACF, dilués à 1/100 et incubés avec du PI de souris CD-1.

---- : Moyenne des souris témoins + 2 x D.S.

Entre a et c et entre c et d :  $p < 0.001$



**Figure 20 :** Analyse statistique par le test t, de la réponse humorale mesurée par ELISA des souris BALB/c allo- ou autoimmunisées avec deux doses de PI isologue (CD-1) ou autologue (BALB/c).

Lecture à 450 nm.

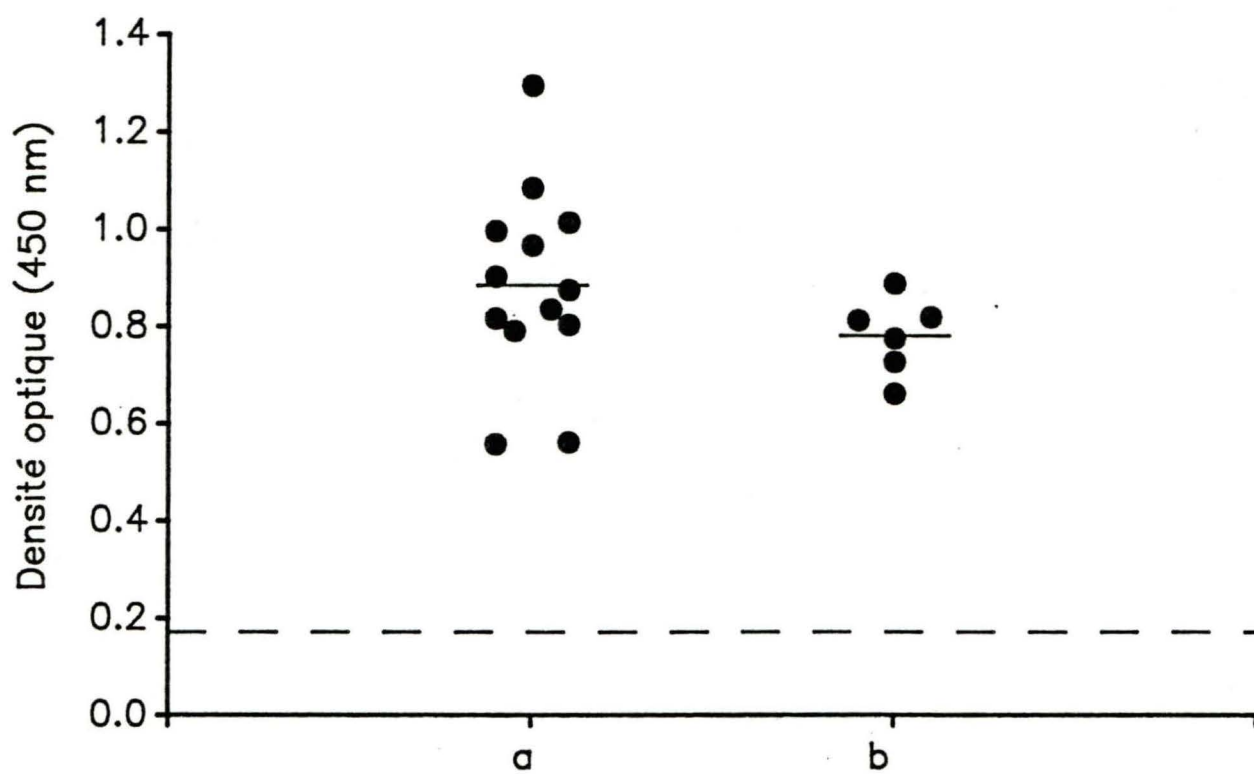
Légende:

a : Sérums isologues des souris BALB/c ayant reçu deux doses de PI de souris CD-1 à 1000 µgN/ACF, dilués à 1/100 et incubés avec du PI de souris CD-1. n = 13.

b : Sérums autologues des souris BALB/c ayant reçu deux doses de PI de souris BALB/c à 1000 µgN/ACF, dilués à 1/100 et incubés avec du PI de souris BALB/c. n = 6.

---- : Moyenne des souris témoins + 2 D.S.

a et b en rapport aux témoins:  $p < 0.001$





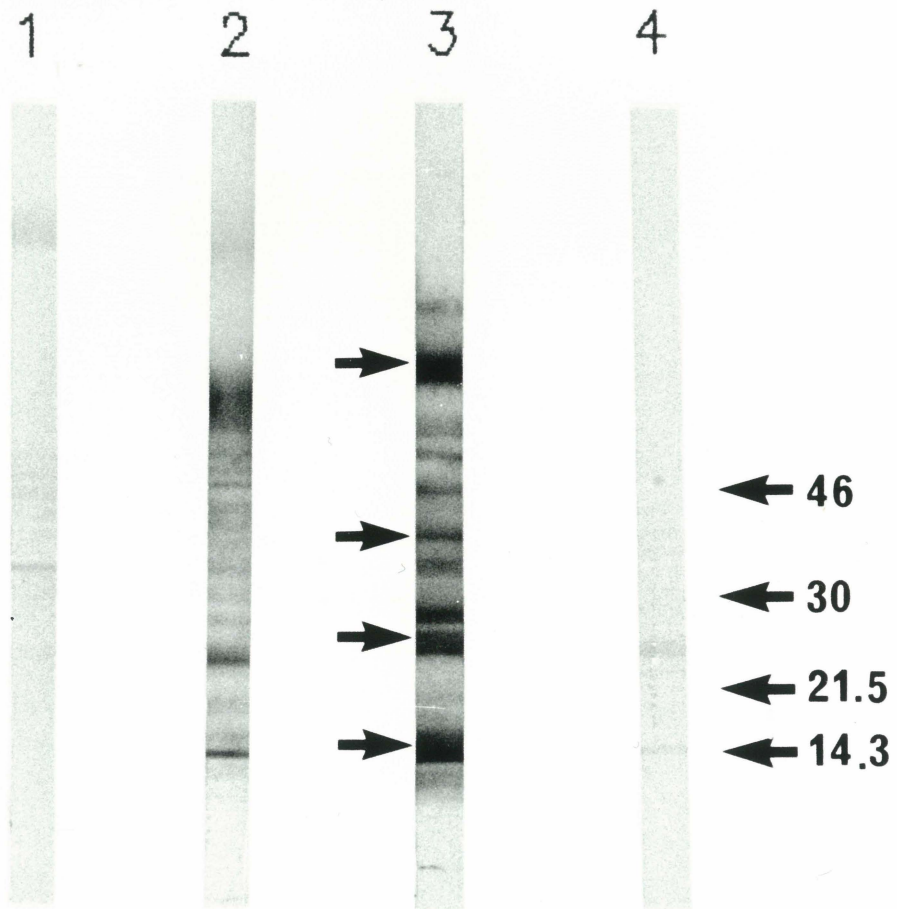
**Figure 21 : Analyse immunochimique de PI de cobaye par immunotransfert, avec le sérum hétérologue anti-PI de cobaye.**

**Légende:**

- 1 : Extrait salin de foie de cobaye Hartley électrotransféré. Incubation avec un "pool" de sérums pré-immuns, dilué à 1/500.**
- 2 : Extrait salin de foie de cobaye Hartley électrotransféré. Incubation avec le sérum hétérologue anti-PI de cobaye, à dilué 1/500.**
- 3 : PI de cobaye Hartley électrotransféré. Incubation avec le sérum hétérologue anti-PI de cobaye, dilué à 1/500.**
- 4 : PI de cobaye Hartley électrotransféré. Incubation avec un "pool" de sérums pré-immuns, dilué à 1/500.**

**→ : Bandes PI-spécifiques.**

Sérum hétérologue  
anti-PI de cobaye



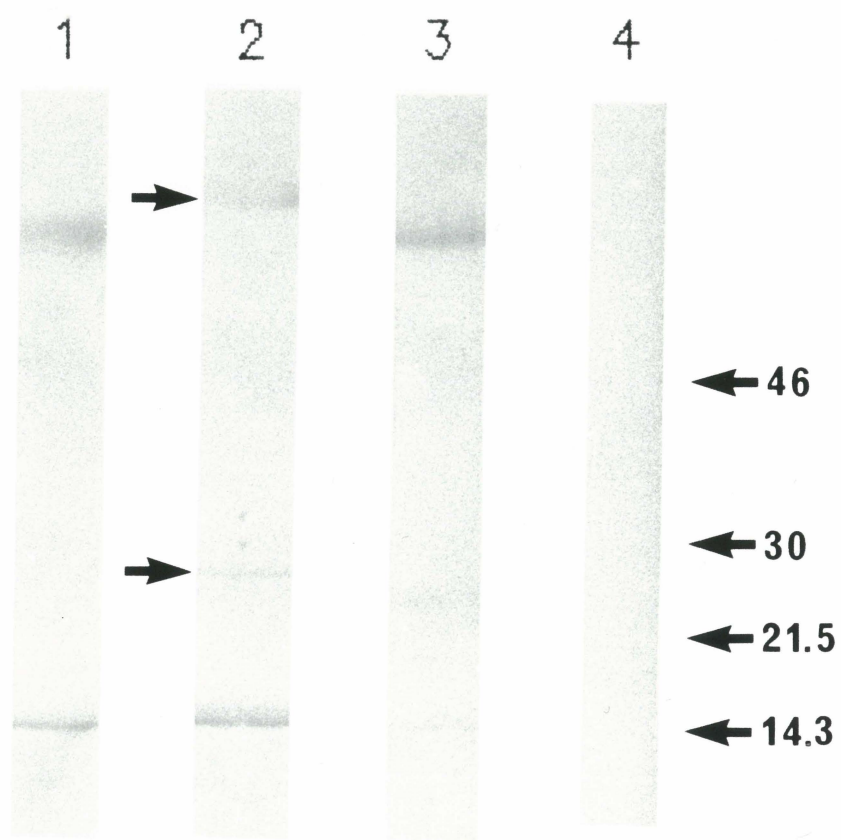
**Figure 22 :** Analyse immunochimique de PI de cobaye par immunotransfert, avec la fraction globulinique du sérum hétérologue anti-PI de cobaye.

Légende:

- 1 : Extrait salin de rein de cobaye Hartley électrotransféré. Incubation avec la fraction globulinique anti-PI de cobaye, diluée à 1/50.
- 2 : PI de cobaye Hartley électrotransféré. Incubation avec la fraction globulinique anti-PI de cobaye, diluée à 1/50
- 3 : Extrait salin de foie de cobaye Hartley électrotransféré. Incubation avec la fraction globulinique anti-PI de cobaye, diluée à 1/50.
- 4 : PI de cobaye Hartley électrotransféré. Incubation avec la fraction globulinique d'un "pool" de sérums pré-immuns, diluée à 1/50.

➡ : Bandes PI-spécifiques.

Fraction globulinique  
anti-PI de cobaye



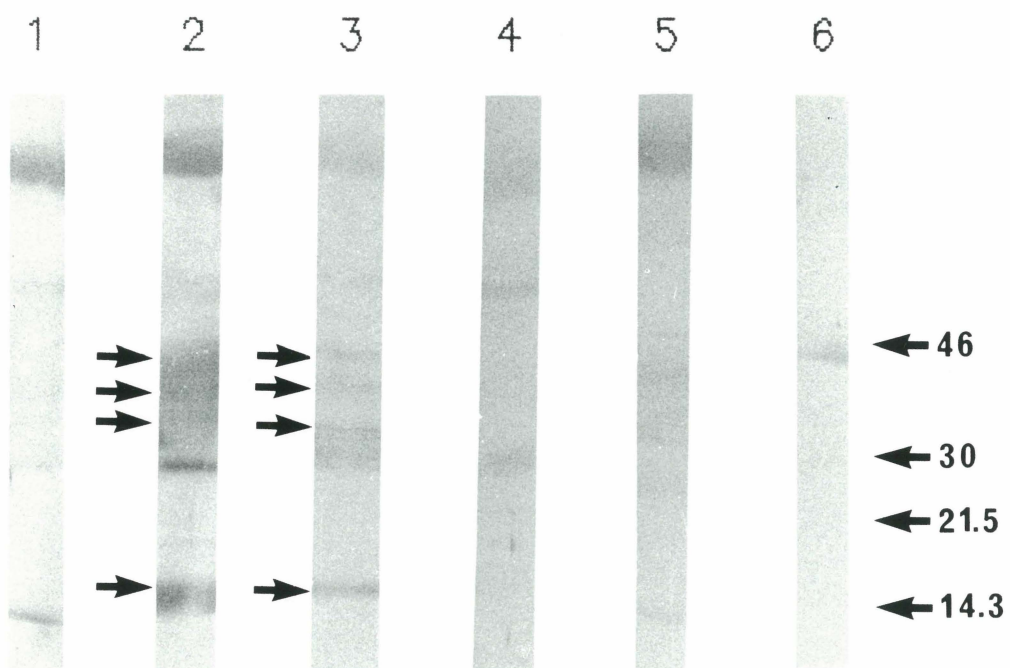
**Figure 23 : Analyse immunochimique de PI de cobaye par immunotransfert, avec le sérum hétérologue anti-PI de cobaye absorbé.**

**Légende:**

- 1 : Extrait de rein de cobaye électrotransféré.  
Incubation avec le sérum hétérologue anti-PI absorbé 4x avec du rein isologue, dilué à 1/100.
- 2 : PI de cobaye électrotransféré. Incubation avec le sérum hétérologue anti-PI absorbé 4 x avec du rein isologue, dilué à 1/100.
- 3 : PI de cobaye électrotransféré. Incubation avec le sérum hétérologue anti-PI absorbé 4 x avec du foie isologue, dilué à 1/100.
- 4 : Extrait de foie de cobaye électrotransféré.  
Incubation avec le sérum hétérologue anti-PI absorbé 4x avec du foie isologue, dilué à 1/100.
- 5 : PI de cobaye électrotransféré. Incubation avec le sérum hétérologue anti-PI absorbé 4 x avec du PI isologue, dilué à 1/100.
- 6 : PI de cobaye électrotransféré. Incubation avec un "pool" de sérums pré-immuns, dilué à 1/100.

**→ : Bandes PI-spécifiques.**

Sérum hétérologue  
anti-PI de cobaye absorbé



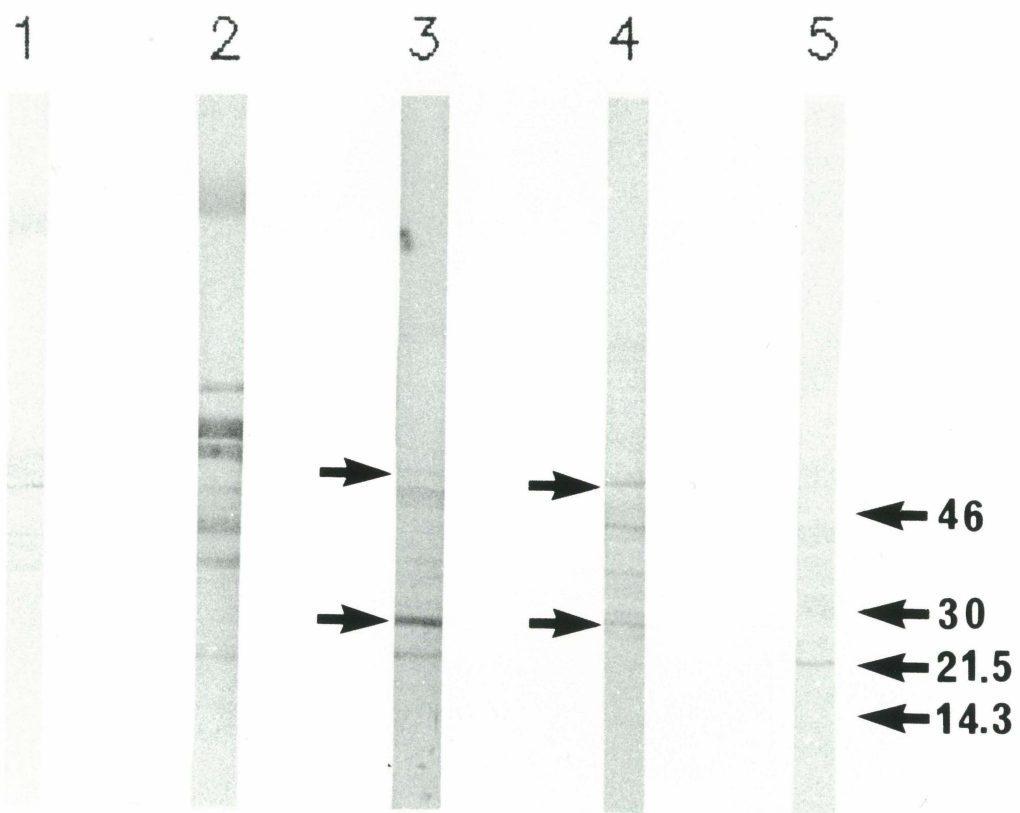
**Figure 24 :** Analyse immunochimique de PI de cobaye par immunotransfert, avec les sérums isologues anti-PI de cobaye.

**Légende:**

- 1 : Extrait de foie de cobaye électrotransféré.  
Incubation avec un "pool" de sérums pré-immuns,  
dilué à 1/10.
- 2 : Extrait de foie de cobaye électrotransféré.  
Incubation avec un "pool" des sérums isologues  
anti-PI de cobaye, dilué à 1/10.
- 3 : PI de cobaye électrotransféré. Incubation avec  
un "pool" des sérums isologues anti-PI de  
cobaye, à dilué 1/10.
- 4 : PI de cobaye électrotransféré. Incubation indi-  
viduelle d'un sérum isologue anti-PI de cobaye,  
dilué à 1/10.
- 5 : PI de cobaye électrotransféré. Incubation avec  
un "pool" de sérums pré-immuns, dilué à 1/10.

**→** : Bandes PI-spécifiques.

Sérums isologues  
anti-PI de cobaye





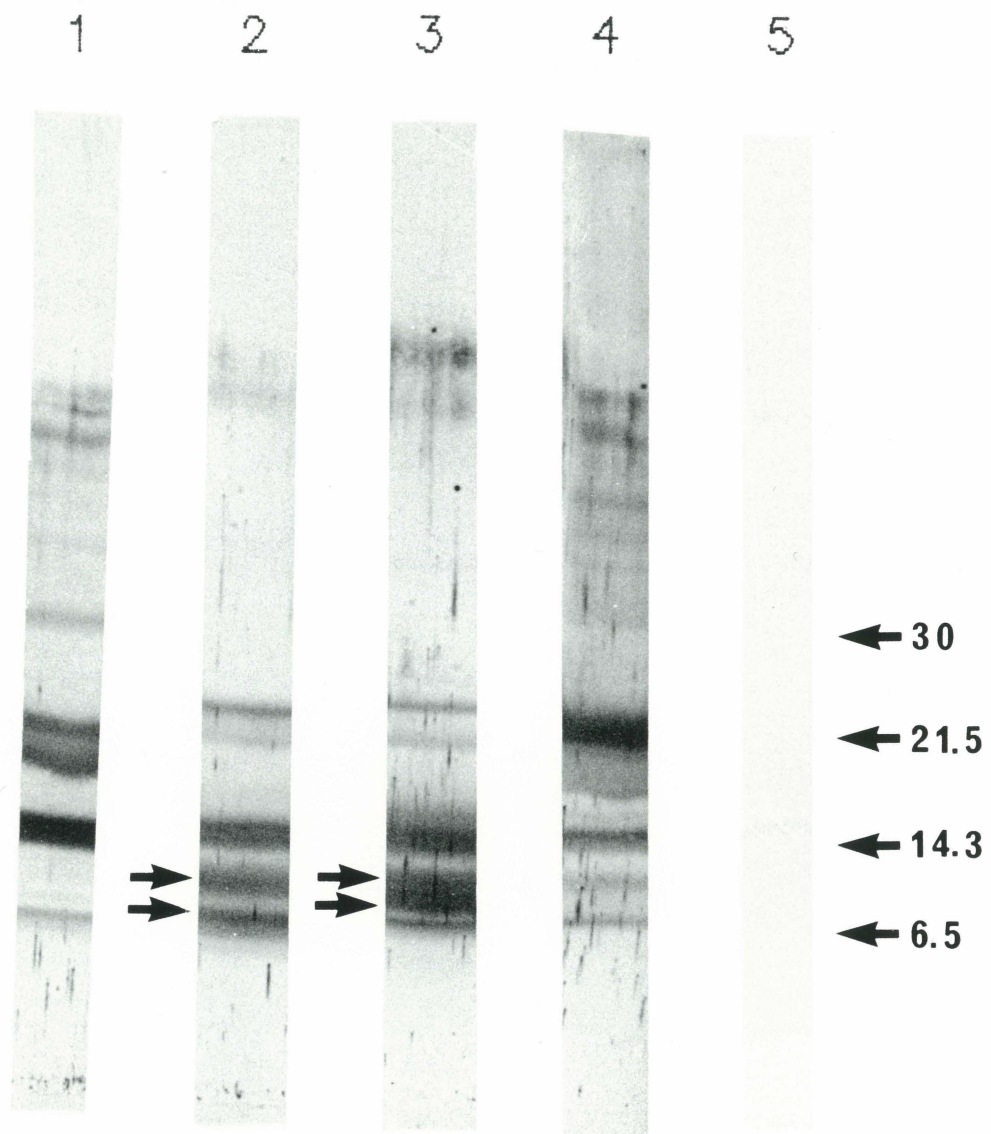
**Figure 25 : Analyse immunochimique de PI de souris BALB/c et CD-1 par immunotransfert, avec le sérum hétérologue anti-PI de souris.**

**Légende:**

- 1 : Extrait de rein de souris CD-1 électrotransféré.  
Incubation avec le sérum hétérologue anti-PI,  
dilué à 1/700.
- 2 : PI de souris CD-1 électrotransféré. Incubation  
avec le sérum hétérologue anti-PI dilué à 1/700.
- 3 : PI de souris BALB/c électrotransféré. Incubation  
avec le sérum hétérologue anti-PI dilué à 1/700.
- 4 : Extrait de foie de souris CD-1 électrotransféré.  
Incubation avec le sérum hétérologue anti-PI,  
dilué à 1/700.
- 5 : PI de souris CD-1 électrotransféré. Incubation  
avec un "pool" de sérums pré-immuns dilué à  
1/700.

**➡ : Bandes PI-spécifiques.**

Sérum hétérologue  
anti-PI de souris



**Figure 26 : Analyse immunochimique de PI de souris par immunotransfert, avec la fraction globulinique du sérum hétérologue anti-PI de souris.**

**Légende:**

**1 : Extrait salin de foie de CD-1 électrotransféré. Incubation avec la fraction globulinique d'un "pool" de sérums pré-immuns, diluée à 1/50.**

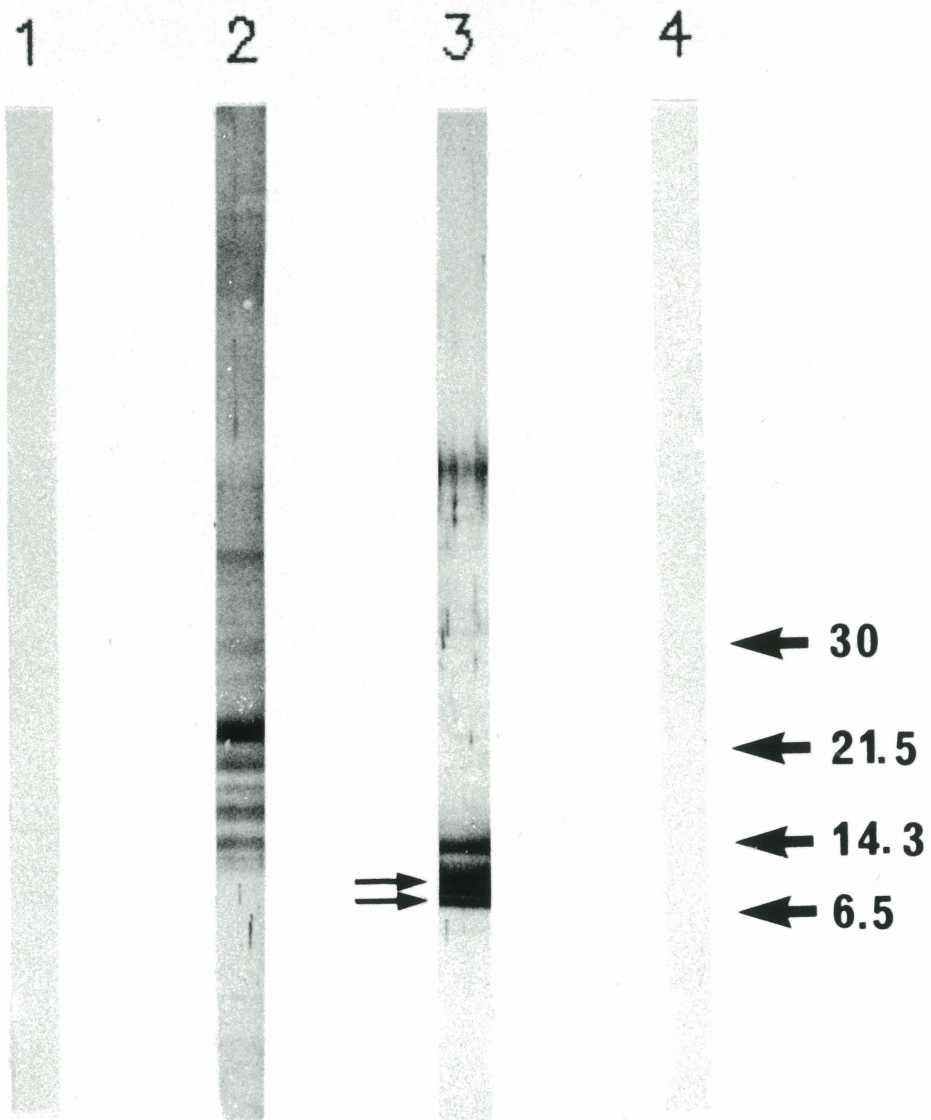
**2 : Extrait salin de foie de CD-1 électrotransféré. Incubation avec la fraction globulinique anti-PI, diluée à 1/50.**

**3 : PI de souris BALB/c électrotransféré. Incubation avec la fraction globulinique anti-PI, diluée à 1/50.**

**4 : PI de souris BALB/c électrotransféré. Incubation avec la fraction globulinique d'un "pool" de sérums pré-immuns, diluée à 1/50.**

**➡ : Bandes PI-spécifiques.**

Fraction globulinique  
anti-PI de souris



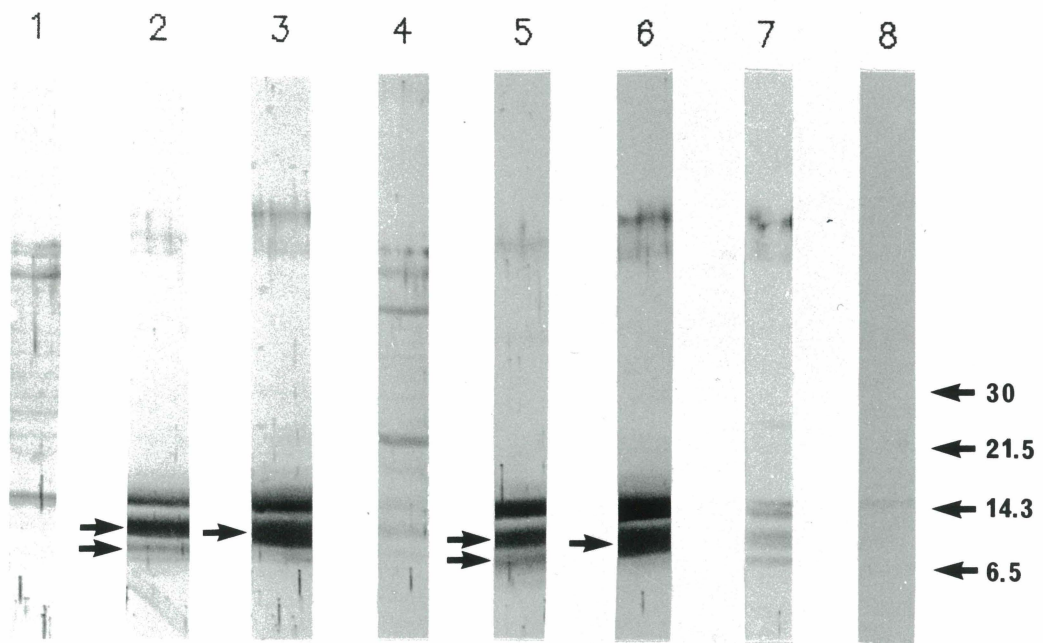
**Figure 27 : Analyse immunochimique de PI de souris BALB/c et CD-1 par immunotransfert, avec le sérum hétérologue anti-PI de souris absorbé.**

**Légende:**

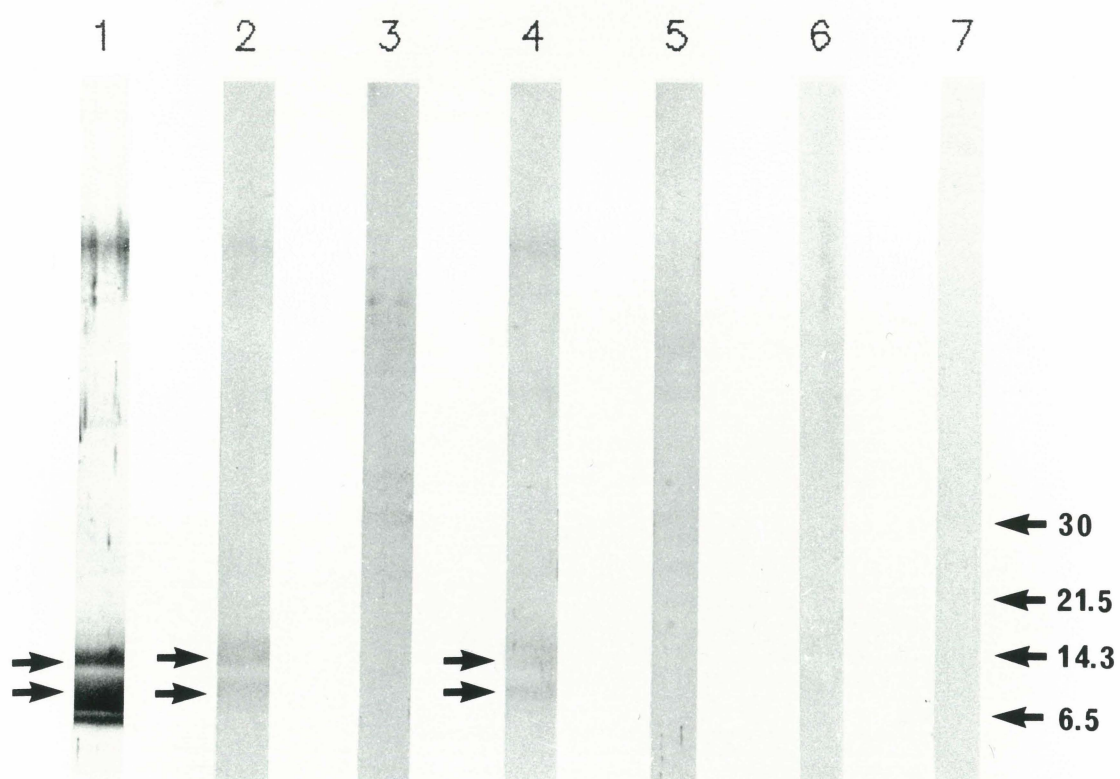
- 1 : Rein de CD-1 électrotransféré, incubé avec anti-PI absorbé 4x avec du rein isologue dilué à 1/500.
- 2 : PI de CD-1 électrotransféré, incubé avec anti-PI absorbé 4x avec du rein isologue, dilué à 1/500.
- 3 : PI de BALB/c électrotransféré, incubé avec anti-PI absorbé 4x avec du rein isologue dilué à 1/500.
- 4 : Foie de CD-1 électrotransféré, incubé avec anti-PI absorbé 4x avec du foie isologue dilué à 1/500.
- 5 : PI de CD-1 électrotransféré, incubé avec anti-PI absorbé 4x avec du foie isologue, dilué à 1/500.
- 6 : PI de BALB/c électrotransféré, incubé avec anti-PI absorbé 4x avec du foie isologue, dilué à 1/500.
- 7 : PI de CD-1 électrotransféré, incubé avec anti-PI absorbé 4x avec du PI isologue, dilué à 1/500.
- 8 : PI de CD-1 électrotransféré, incubé avec un "pool" de sérums pré-immuns absorbé 4 x avec du PI, du foie, et du rein isologue, dilué 1/500.

➡ : Bandes PI-spécifiques.

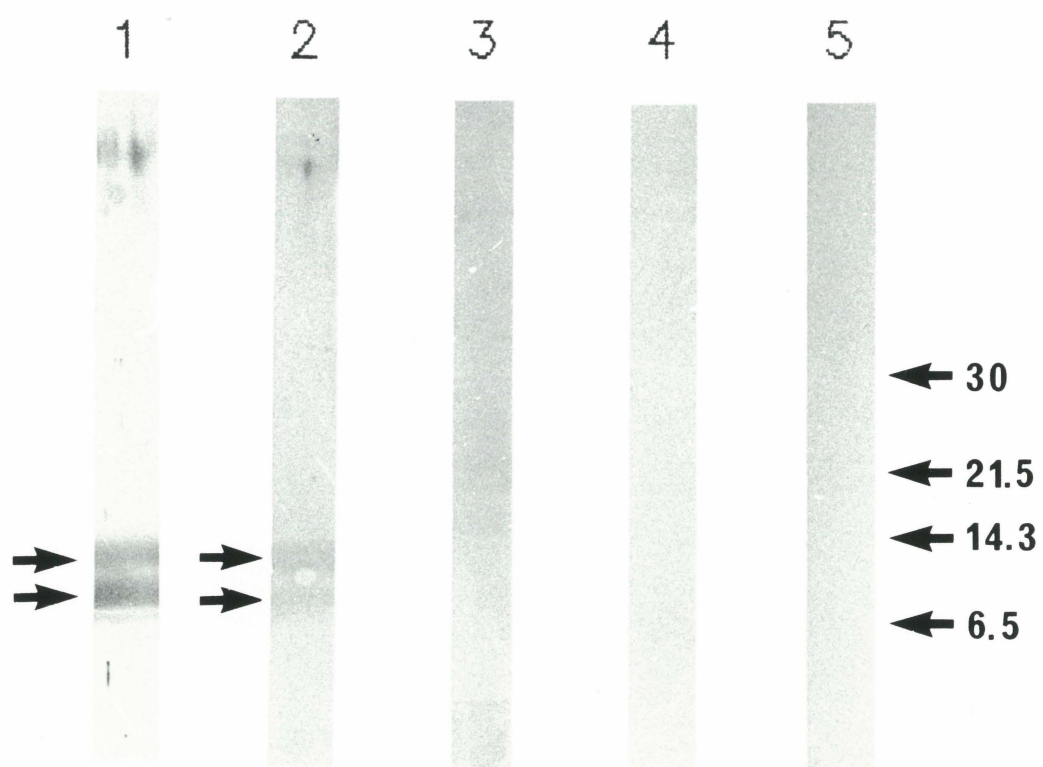
Sérum hétérologue  
anti-PI de souris absorbé



Sérums isologues  
anti-PI de souris



Sérums autologues  
anti-PI de souris





**Figure 29 :** Analyse immunochemique de PI de souris BALB/c par immunotransfert, avec les sérums autologues anti-PI de souris.

**Légende:**

- 1 : PI de souris BALB/c électrotransféré. Incubation avec la fraction globulinique du sérum hétérologue anti-PI de souris, dilué à 1/50.
- 2 : PI de souris BALB/c électrotransféré. Incubation avec anti-PI autologue, dilué à 1/20.
- 3 : Extrait de foie isologue électrotransféré. Incubation avec anti-PI autologue, dilué à 1/20.
- 4 : PI de souris BALB/c électrotransféré. Incubation avec un "pool" de sérums pré-immuns, dilué à 1/20.
- 5 : Extrait de foie isologue électrotransféré. Incubation avec un "pool" de sérums pré-immuns, dilué à 1/20.

➡ : Bandes PI-spécifiques.

# Sérums autologues anti-PI de souris

1 2 3 4 5



## RÉFÉRENCES

1. Aas, J., Huizenga, K.A., Newcomer, A.D., and Shorter, R.G. (1972) Inflammatory bowel disease: Lymphocyte responses to nonspecific stimulation in vitro. Scand. J. Gastroenterol., 7;299-303.
2. Ada, G.L., and Nossal, G.J.V. (1987) The clonal selection theory. Sci. Am. 257;62.
3. Allen, D.C., Biggart, J.D., Orchin, J.C., and Foster, H. (1985) An immunoperoxidase study of epithelial marker antigens in ulcerative colitis with dysplasia and carcinoma. J. Clin. Path. 38;18-29.
4. Allison, A.C., Denman, A.M., and Barnes, R.D. (1971) Cooperating and controlling functions of thymus-derived lymphocytes in relation to autoimmunity. Lancet 2;135-142.
5. Arnason, B.G.W. (1985) Chap.15 Multiple sclerosis, allied central nervous system diseases, and immune-mediated neuropathies. The Autoimmune Diseases. Rose, N.R., and Mackay, I.R., editors. Academic Press, Inc. pp.400-427.
6. Aronson, R.A., Cook, S.L., and Roche, J.K. (1983) Sensitization to epithelial antigens in chronic mucosal inflammatory disease: I. Purification, characterization and immune reactivity of murine epithelial

- cell-associated components (ECAC). J. Immunol. 131(6);2796-2804.
7. Asherson, G.L., and Dumonde, D.C. (1963) Autoantibody production in rabbits: II. Organ-specific autoantibody in rabbits injected with rat tissues. Immunology 6;19-29.
8. Asherson, G.L., and Holborow, E.J. (1966) Autoantibody production in rabbits: VII. Autoantibodies to gut produced by the injection of bacteria. Immunology 10;161-167.
9. Bagchi, S., Baral, B., and Das, K.M. (1986) Isolation and characterization of Crohn's disease tissue-specific glycoproteins. Gastroenterol. 91;326-332.
10. Balfour-Strator, R., Croartie, W.J., Powel, D.W., and Schwab, J.H. (1985) Granulomatous enterocolitis induced in rats by purified bacterial cell wall fragments. Gastroenterol. 89;587-595.
11. Banga, J.P., Pryce, G., Hammond, L., and Roitt, I.M. (1985) Structural features of the autoantigens involved in thyroid microsomoal/microvillar antigen. Mol. Biol. 22;629-642.

12. Beeken, W.L., Mitchell, D.N., and Cave, D.R. (1976) Evidence for a transmissible agent in Crohn's disease. Clin. Gastroenterol. 5-289-302.
13. Beisiegel, U. (1986) Protein blotting. Electrophoresis 7;1.
14. Benacerraf, B. (1981) Role of MHC gene products in immune regulation. Science 212;1229-1238.
15. Ben-Nun, A., and Lando, Z. (1983) Detection of autoimmune cells proliferating to myelin basic protein and selection of T-cell lines that mediated experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in mice. J. Immunol. 130;1205.
16. Bernard, C.C.A. (1976) Experimental autoimmune encephalomyelitis in mice: Genetic control of susceptibility. J. Immunogenetics 1;352.
17. Bernard, C.C.A. (1977) Suppressor T cells prevent experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. Clin. Exp. Immunol. 29;100-109.
18. Bigazzi, P.E., and Rose, N.R. (1985) Chap. 7 Autoimmune thyroid disease. The Autoimmune Disease. Rose, N.R. & Mackay, I.R., Eds. Academic Press. LaJolla, California.

19. Bigazzi, P.E., and Rose, N.R. (1975) Spontaneous autoimmune thyroiditis in animals as a model of human disease. *Prog. Allergy* 19;245-274.
20. Bolton, P.M., Heatley, R.V., Owen, E., Williams, W.J., and Hughes, L.E. (1974) Aetiology of Crohn's disease. *Lancet* oct. 19;951.
21. Broberger, O. (1961) Studies of the immunological relationship between the antigens from different organs in human ulcerative colitis. *Acta. Paediatrica* 50;577-580.
22. Broberger, O. (1964) Immunological studies in ulcerative colitis. *Gastroenterol.* 47(3);229-240.
23. Broberger, O., and Perlmann, P. (1963) In vitro studies of ulcerative colitis: I. Reactions of patients serum with human fetal colon cells in tissue culture. *J. Exp. Med.* 117;705.
24. Broberger, O., and Perlmann, P. (1962) Demonstration of epithelial antigen in colon by means of fluorescent antibodies from children with ulcerative colitis. *Ibid* 115;13-25.
25. Broberger, O., and Perlmann, P. (1959) Autoantibodies in human ulcerative colitis. *J. Exp. Med.* 110;657-674.

26. Burnet, F.M. (1972) A reassessment of the forbidden clones hypothesis of autoimmune disease. Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci. 50;1.
27. Burnet, F.M. (1961) Immunological recognition of self. Science 133;307.
28. Callaban, H.J., and Maurer, P.H. (1978) Chap.1 Antigens, haptens and antigenic determinants. Immunological Diseases 3<sup>rd</sup> Edition Vol. 1. Max Samter Editor. Little, Brown and Company.
29. Cantor, H., and Boyse, E.A. (1977) Regulation of cellular and humoral immune responses by T cell subclasses. Cold Spring Harvor Symp. Quant. Biol. 41;23.
30. Caspi, R.R., Roberge, F.G., Chan, C.-C., Wiggert, B., Chader, G.J. Rozenszajn, L.A., Lando, Z., and Nussenblatt, R.B. (1988) A new model of autoimmune disease: Experimental autoimmune uveoretinitis induced in mice with two different retinal antigens. J. Immuno. 140(5);1490-1495.
31. Chao, L.P., Steele, J., Rodrigues, C., Lennard-Jones, J., Stanford, J.L., Spiliadis, C., and Rook, G.A.W. (1988) Specificity of antibodies secreted by hybridomas generated from activated B cells in the mesenteric lymph



- nodes of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 29;35-40.
32. Charron, D. (1986) Un modèle et trois exemples pour comprendre HLA et maladies. *Path. Biol.* 34(6);795-800.
33. Chess, S., Olander, G., Puestaw, C.B., Benner, W., and Chess, D. (1950) Regional enteritis: Clinical and experimental observations. *Surg. Gynecol. Obstet.* 91;343-350.
34. Chester, J.F., Ross, J.S., Malt, R.A., and Weitzman, S.A. (1985) Acute colitis produced by chemotactic peptides in rats and mice. *Am. J. Path.* 121(2);284-290.
35. Chiller, J.M., Habicht, G.S., and Weigle, W.O. (1970) Cellular sites of immunologic unresponsiveness. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 65;551.
36. Cooke, E.M., Filipe, M.I., and Dawson, I.M.P. (1968) The production of colonic autoantibodies in rabbits by immunization with *Escherichia coli*. *J. Path. Bact.* 96;125-130.
37. Cottone, M., Bunce, M., Taylor, C.J., Ting, A., and Jewell, D.P. (1985) Ulcerative colitis and HLA phenotype. *Gut* 26;952-954.

38. Dekker-Saeys, B.J., Meuwissen, S.G.M., VanDen Berg-Loonen, E.M., De Haas, W.H.D., Meijers, K.A.F., and Tytgat, G.N.J. (1978) III. Clinical characteristics and results of histocompatibility typing (HLA B27) in 50 patients with both ankylosing spondylitis and inflammatory bowel disease. *Ann. Rheum. Dis.* 37;36-41.
39. Diener, E. (1986) Tolerance and autoimmunity. *Immunol. Today* 7;5.
40. Dow, C.A., De Aizpurua, H.J., Pedersen, J.S., Ungar, B., and Toh, B.H. (1985) 65-70 Kd protein identified by immunoblotting as the presumptive gastric microsomal autoantigen in pernicious anaemia. *Clin. Exp. Immunol.* 62;732-737.
41. Eden, A., Bianco, C., and Nussenzweig, V. (1973) Mechanisms of binding of soluble immune complexes to lymphocytes. *Cell. Immunol.* 7;459-473.
42. Elson, C.O., Kagnoff, M.F., Fiocchi, C., Befus, A.D., and Targan, S. (1986) Intestinal immunity and inflammation: Recent progress. *Gastroenterol.* 91;746-768.
43. Ernst, P.B., Underdown, B.J., and Bienenstock, J. (1987) Chap. 12 Immunity in mucosal tissues. *Basic & Clinical Immunology* 6<sup>th</sup> Edition, Stites, Stobo and Wells.

Appleton & Lange ed. pp. 159-166.

44. Feinglass, E.J., Arnett, F.C., Dorsch, C.A., Zizic, T.M., and Stevens, M.C. (1976) Neuropsychiatric manifestation of SLE: Diagnosis, clinical spectrum and relationship to other features of the disease. *Medecine* (Baltimore) 55;323.
45. Ferguson, A. (1980) 5. Gastrointestinal immunology. Sirous & Smith, N. Scientific foundations of gastroenterology, Philadelphie, W.B. Sanders Company. pp. 51-67.
46. Ferguson, T.A., Ptak, W., Iverson, G.M., and Flood, P. (1988) The role of suppression in immunoregulation: in vivo analysis using a monoclonal antibody to T suppressor factors. *Eur. J. Immunol.* 18;1179-1185.
47. Ferrell, P.B., and Tan, E.M. (1985) Chap 2. Systemic lupus erythematosus. *Autoimmune Diseases*. Rose, N.R., and Mackay, I.R., editors. Academic Press, Inc.
48. Fiocchi, C., Battisto, J.R., and Farmer, R.G. (1979) Gut mucosal lymphocytes in inflammatory bowel disease: Isolation and preliminary functional characterization. *Dig. Dis. Sci.* 24(9);705-717.

49. Ford, H., and Kirsner, J.B. (1967) Iso-antibodies to colon. *Int. Arch. All. App. Immunol.* 31;449-454.
50. Forstner, J., Taichman, N., Kalnins, V., and Forstner, G. (1973) Intestinal goblet cell mucus: Isolation and identification by immunofluorescence of a goblet cell glycoprotein. *J. Cell. Sci.* 12;585-602.
51. Fravi, G., and Lindenmann, J. (1968) Induction by allogenic extracts of liver-specific precipitating autoantibodies in the mouse. *Nature* 218;141-143.
52. Freund, J., and Stone, S.H. (1959) The effectiveness of tuberculo-glycolipid as an adjuvant in eliciting allergic encephalomyelitis and aspermatogenesis. *J. Immunol.* 82;560.
53. Fujii, Y., and Lindstrom, J. (1988) Regulation of antibody production by helper T cell clones in experimental autoimmune myasthenia gravis. *J. Immunol.* 141(10);3361-3369.
54. Fusch, S. (1980) Experimental autoimmune myasthenia gravis: Recent development. *Trends Biochem. Sci.* 5(10);259-267.
55. Gasser, D.L., Newlin, C.M., Palm, J., and Gonatas, N.K. (1973) Genetic control of susceptibility to experimental

allergic encephalomyelitis in rats. Science  
181;872-873.

56. Gebbers, J.-O., and Otto, H.F. (1985) Alterations of the mucosal block in ulcerative colitis and Crohn's disease: Immunological and ultrastructural findings, and considerations of the pathogenesis. Klin. Pädiat. 197;341-348.
57. Gershon, R.K. (1974) T cell control of antibody production. Contemp. Top. Immunobiol. 3;1-40.
58. Gershoni, J.M., and Palade, G.E. (1982) Electrophoretic transfert of protein from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to a positively charged membrane filter. Anal. Biochem. 124;396.
59. Gershoni, J.M., and Palade, G.E. (1983) Protein blotting: Principles and applications. Anal. Biochem. 131;1.
60. Gibson, P.R., and Jewell, D.P. (1986) Local immune mechanisms in inflammatory bowel disease and colorectal carcinoma: Natural killer cells and their activity. Gastroenterol. 90;12-19.
61. Ginsberg, A.L. (1971) Alterations in immunologic mechanisms in diseases of the gastrointestinal tract. Am. J.

- Dig. Dis. 16(1);61-80.
62. Goding, J.W. (1976) Conjugation of antibodies with fluorochromes: Modifications to the standard methods. J. Imm. Meth. 13;215-226.
63. Gorai, I., Aihara, M., Bixler Jr, G.S., Atassi, M.Z., Walden, P., and Klein, J. (1988) T cell response to myoglobin: a comparison of T cell clones in high-responder and low-responder mice. Eur. J. Imm. 18;1329-1335.
64. Goronzy, J., Weyand, C.M., and Waase, I. (1985) T cell subpopulations in inflammatory bowel disease: Evidence for a defective induction of T<sub>8</sub>+ suppressor/cytotoxic T lymphocytes. Clin. Exp. Immunol. 61;593-600.
65. Green, J.R., Chiew, M.K., Low, H.C., and Woodrow, J.C. (1983) The association between HLA antigens and the presence of certain diseases. Stat. Med. 2;79-85.
66. Hanauer, S.B., and Kraft, S.C. (1985) Chap.11 Inflammatory bowel diseases. The Autoimmune Diseases. Rose, N.R. and Mackay, I.R. editors. Academic press, Inc. pp. 267-289.
67. Happ, M.P., Wettstein, P., Dietzschold, B., and Heber-Katz, E. (1988) Genetic control of the development of

- experimental allergic encephalomyelitis in rats: Separation of MHC and non-MHC gene effects. *J. Immunol.* 141(5);1489-1494.
68. Harrison, L.C. (1985) Chap. 23 Anti-receptor antibodies. *The Autoimmune Diseases*. Rose, N.R. and Mackay, I.R. editors. Academic press. inc., LaJolla. Ca.
69. Harrison, W.J., and Oxon, B.M. (1965) Autoantibodies against intestinal and gastric mucus cells in ulcerative colitis. *Lancet* june 26;1346-1350.
70. Hausamen, T.-U., Halcrow, D.A., and Taylor, K.B. (1969) Biological effects of gastrointestinal antibodies. III. The effects of heterologous and autoantibodies on deoxyribonucleic acid synthesis in the stomach and colon of guinea pigs and rabbits. *Gastroenterol.* 56(6);1071-1077.
71. Haviland, A.E., and Roche, J.K. (1986) Immune sensitization to syngeneic organ-specific intestinal antigens in the Lewis rat. *Cell. Immunol.* 100;541-554.
72. Herberman, R.B., Djeu, J.Y., Kay, H.D., Ortaldo, J.R., Riccardi, C., Bonnard, G.D., Holden, H.T., Fagani, R., Santoni, A., and Pucetti, P. (1979) Natural killer cells: Characteristics and regulation of activity. *Immunol. Rev.* 44;43-70.

73. Hibi, T., Aiso, S., Yoshida, T., Watanabe, M., Asa, K.H., and Tsuehiya, M. (1982) Anti-colon antibody and lymphocytophilic antibody in ulcerative colitis. Clin. Exp. Immunol. 49;75-80.
74. Hickey, W.F., Kirby, W.M., and Teuscher, C. (1986) Balb/c substrain differences in susceptibility to experimental allergic encephalomyelitis (EAE). Ann. N.Y. Acad. Sci. 475;331-333.
75. Hirata, I., Berrebi, G., Austin, L.L., Keren, D.F., and Dobbins III, W.O. (1986) Immunohistological characterization of intra epithelial and Lamina Propria lymphocytes in control ileum and colon and in inflammatory bowel disease. Dig. Dis. Sci. 31(6);593-603.
76. Hodgson, H.J.F., Wands, J.R., and Isselbacher, K.J. (1978) Decreased suppressor cell activity in inflammatory bowel disease. Clin. Exp. Immunol. 32;451-458.
77. Holborow, E.J., Asherson, G.L., and Wigley, R.D. (1963) Autoantibody production in rabbits. VI. The production of autoantibodies against rabbit gastric, ileal and colonic mucosa. Immunol. 6;551-560.



78. Holmgren, J., Hammarström, S., Holm, S.E., Ahlmén, J., Attman, P.O., and Jodal, U. (1972) An antigenic relationship between human kidney, colon and the common antigen of Enterobacteriaceae. *Int. Arch. All.* 43;89-97.
79. James, S.P., Fiocchi, C., Graeff, A.S., and Strober, W. (1986) Phenotypic analysis of lamina propria lymphocytes. Predominance of helper-inducer and cytolytic T-cell phenotypes and deficiency of suppressor-inducer phenotypes in Crohn's disease and control patients. *Gastroenterol.* 91;1483-1489.
80. James, S.P., Nekers, L.M., Graeff, A.D., Cossman, J., Balch, C.M., and Strober, W. (1984) Suppression of immunoglobulin synthesis by lymphocyte subpopulations in patients with Crohn's disease. *Gastroenterol.* 86;1510-1518.
81. Jewell, D.P. (1975) Ulcerative colitis. *Front. Gastro-intest. Res.* 1;125-141.
82. Johnson, G.D., Asherson, G.L., Kaklamanis, E., and Dumonde, D.C. (1963) Demonstration by immunofluorescence of auto-antibody in the serum of rabbits given injections of rat tissue. *J. Path. Bact.* 86;521-525.

83. Karlsson, F.A., Burman, P., Lööf, L., Olsson, M., Scheynius, A., and Mardh, S. (1987) Enzyme-linked immunosorbent assay of  $H^+$ ,  $K^+$ -ATPase, the parietal cell antigen. Clin. Exp. Immunol. 70;604-610.
84. Karlsson, F.A., Burman, P., Lööf, L., and Mardh, S. (1988) Major parietal cell antigen in autoimmune gastritis with pernicious anemia is the acid-producing  $H^+$ ,  $K^+$ -Adenosin triphosphatase of the stomach. J. Clin. Invest. 81;475-479.
85. Katz, D.H., and Skidmore, B.J. (1977) Self recognition as the predominant mechanism for communication in the immune system. Progress in Immunology, vol. 3. Mandel, T.E., Cheers, C., Hosking, C.S., Mc Kenzie, I.F.C., and Nossal, G.J.V., editors. Aust. Acad. Sci., Canberra. pp.322-328.
86. Katz, D.H. (1978) Self-recognition as a mean of cell communication in the immune system. Cell-cell Recognition. Curtis, A.S.G., editor. Cambridge University Press, New York. pp.411-427.
87. Kemler, B.J., and Alpert, E. (1980) Immune regulation in inflammatory bowel disease: Absence of a serum inhibitor of suppressor cell function. Clin. Exp. Immunol. 42;280-284.

88. Kirsner, J.B. (1970) Ulcerative colitis 1970-recent developments. Scand. J. Gastroenterol. 6 supp.;63-91.
89. Kirsner, J.B. (1966) Autoimmune Disease - 4 possible immune mechanisms in ulcerative colitis. Postgrad. Med. octobre;387-390.
90. Kirsner, J.B., Elchlepp, J.G., Goldgraber, M.B., Ablaza, J., and Ford, H. (1959) Production of an experimental ulcerative "colitis" in rabbits. Arch. Path. Lab. Med. 68;392.
91. Kirsner, J.B., and Goldberger, M.B. (1960) Hypersensitivity, autoimmunity and the digestive tract. Gastroenterol. 38;356.
92. Kirsner, J.B., and Palmer, W.L. (1954) Ulcerative colitis: Consideration of its etiology and treatment. J.A.M.A. 155(4);341-346.
93. Kirsner, J.B., and Shorter, R.G. (1982) Recent developments in nonspecific inflammatory bowel disease. New Engl. J. Med. 306;775-785, 837-848.
94. Kirsner, J.B., and Shorter, R.G. (1980) Inflammatory Bowel Disease, 2<sup>nd</sup> Ed. Lea & Febiger, Philadelphia.

95. Klavins, J.V. (1962) Demonstration of an antibody in serum of ulcerative colitis which combines with cytoplasm of the colonic mucosal cells. J.A.M.A. 180(9);759.
96. Klavins, J.V. (1963) Cytoplasm of colonic mucosal cells as site of antigen in ulcerative colitis. Ibid 183;547-548.
97. Koffler, D., Minkowitz, S., Rothman, W., and Garlock, J. (1962) Immunocytochemical studies in ulcerative colitis and regional ileitis. Am. J. Path. 41(6);733-745.
98. Kraft, S.C. (1979) Inflammatory bowel disease (ulcerative colitis and Crohn's disease). Immunology of the gastrointestinal tract. Asquith, P. editor. Churchill Livingstone, Edinburgh-London-New York. pp.95-128.
99. Kraft, S.C., and Kirsner, J.B. (1980) The immunology of ulcerative colitis and Crohn's disease: Clinical and humoral aspects. Inflammatory Bowel Disease 2<sup>nd</sup> Edition. Kirsner, J.B. and Shorter, R.G., editors. Lea & Febiger - Philadelphia. pp. 86-120.
100. Kraft, S.C., and Kirsner, J.B. (1971) Immunological apparatus of the gut and inflammatory bowel disease. Gastroenterol. 60(5);922-951.

101. Lagercrantz, R., Hammarström, S., Perlmann, P., and Gustafsson, B.E. (1966) Immunological studies in ulcerative colitis: Incidence of autoantibodies to colon-antigen in ulcerative colitis and other gastrointestinal diseases. Clin. Exp. Immunol. 1;263-276.
102. Lando, Z., Teitelbaum, D., and Arnon, R. (1979) Genetic control of susceptibility to experimental allergic encephalomyelitis in mice. Immunogenetics 9;435-442.
103. Le Veen, H.H., Falk, G., and Schatman, B. (1961) Experimental ulcerative colitis produced by anti-colon sera. Ann. Surg. 154(2);275-280.
104. Levine, S., and Sowinski, R. (1974) Experimental allergic encephalomyelitis in congenic strains of mice. Immunogenetics 1;352.
105. Levine, S., and Sowinski, R. (1973) Experimental allergic encephalomyelitis in inbred and outbred mice. J. Immunol. 110(1);139-143.
106. Little, M.E., and Roche, J.K. (1988) Shared and unique determinants on human and murine intestinal epithelium as established by monoclonal antibodies. Molec. Immunol. 25(3);275-283.

107. Lowry, O.H., Rosebrough, W.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193;265-275.
108. Mackay, I.R., Frazer, I.H., McNeilage, L.J., and Whittingham, S. (1986) Auto-epitopes and autoimmune diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci. USA* 475;59-65.
109. MacDermott, R.P., Bragoon, M.J., Kodner, I.J., and Bertovich, J. (1986) Deficient cell-mediated cytotoxicity and hyporesponsiveness to interferon and mitogenic lectin activation by inflammatory bowel diseases peripheral blood and intestinal mononuclear cells. *Gastroenterol.* 90;6-11.
110. MacPherson, B.R., and Pfeiffer, C.J. (1978) Experimental production of diffuse colitis in rats. *Digestion* 17;135-150.
111. Marcus, R., and Watt, J. (1974) Ulcerative disease of the colon in laboratory animals induced by pepsin inhibitors. *Gastroenterol.* 67(3);473-483.
112. Maron, R., Zerubavel, R., Friedman, A., and Cohen, I.R. (1983) T lymphocyte line specific for thyroglobulin produces or vaccinates against autoimmune thyroiditis in mice. *J. Immunol.* 131;2316.

113. Mayberry, J.F. (1985) Some aspects of the epidemiology of ulcerative colitis. *Gut* 26;968-074.
114. Mc Cluskey, R.T. (1982) The value of the renal biopsy in lypus nephritis. *Arth. Rheum.* 25;867.
115. Mc Coy Jr., J.P., Michaelson, Jo.H., and Bigazzi, P.E. (1982) Anti-idiotypic immunity and autoimmunity: III. Investigations in human autoimmune thyroiditis. *Life Sci.* 32;109-118.
116. Mc Devitt, H.O., and Benacerraf, B. (1969) Genetic control of specific immune response. *Adv. Immunol.* 11;31-74.
117. Melnyk, C.S. (1980) Experimental enteritis and colitis. *Inflammatory Bowel Disease*. 2<sup>nd</sup> Edition. Kirsner, J.B. and Shorter, R.G., editors. Lea & Febiger, Philadelphia. pp.25-43.
118. Metalnikoff, S. (1900) Etudes sur la spermatoxine. *Ann. Inst. Pasteur* 14;577-589.
119. Miller, R.D., and Calkins, C.E. (1988) Development of self-tolerance in normal mice: Appearance of suppressor cells that maintain autoantibody response. *J. Immunol.* 141(7);2206-2210.

120. Miller, J.F.A.P., and Mitchell, G.F. (1970) Cell to cell interaction in the immune response: V. Target cells for tolerance induction. *J. Exp. Med.* 131;675.
121. Mowat, A. McI., and Felstein, M.V. (1987) Experimental studies of immunologically mediated enteropathy. II. Role of natural killer cells in the intestinal phase of murine graft-versus-host reaction. *Immunol.* 61;179-183.
122. Mowat, A. McI., Felstein, M.V., and Baca, M.E. (1987) Experimental studies of immunologically mediated enteropathy. III. Severe and progressive enteropathy during a graft-versus-host reaction in athymic mice. *Immunol.* 61;185-188.
123. Nairn, R.C., Fothergill, J.E., Mc Entegart, M.G., and Porteous, I.B. (1962) Gastro-intestinal-specific antigen: An immunohistological and serological study. *Brit. Med. J.* i;1788-1791.
124. Nelson, D.S. (1981) Macrophages: Progress and problems. *Clin. Exp. Immunol.* 45;225-233.
125. Nelson, D.S., and Boyden, S.V. (1967) Macrophage cytophilic antibodies. *Brit. Med. Bull.* 23;15-20.



126. Nemirovsky, M.S., and Hugon, J.S. (1986) Immunopathology of guinea pig autoimmune enterocolitis induced by alloimmunization with an intestinal protein. *Gut* 27;1434-1442.
127. Nemirovsky, M.S., and Després, N. (1987) Immunological and immunopathological characterization of a mucosal antigen from guinea pig small intestine. *Adv. Exp. Med. Biol.* 216a;783-789.
128. Nemirovsky, M.S., and Després, N. (1989) Immunopathology of inbred mice immunized with a mucosal antigen. *Soumis.*
129. Nemirovsky, M.S., and Després, N. (1989) Immunoblotting analysis of a mucosal antigen extracted from guinea-pig and mouse small intestine. *Soumis.*
130. Nossal, G.J.V. (1988) Cellular mechanisms in B lymphocyte activation and tolerance. *J. Immunol.* 141(7);S-21 - S-24.
131. Nossal, G.J.V. (1983) Cellular mechanisms of immunological tolerance. *Annu. Rev. Immunol.* 1;33-62.
132. Nossal, G.J.V., and Pike, B.L. (1975) Evidence for the clonal abortion theory of B-lymphocyte tolerance. *J. Exp. Med.* 141;904.

133. Nussenblatt, R.B., and Silverstein, A.M. (1985) Chap. 14  
Ocular diseases of presumed autoimmune origin. The  
Autoimmune Diseases. Rose, N.R. and Mackay, I.R.,  
editors. Academic Press. Inc.
134. Orr, M.M., Tamarind, D.L., Cooke, J., Fincham, W.J.,  
Hawley, P.R., Quilliam, J.P., and Irving, M.H. (1974)  
Preliminary studies on the response of rabbit bowel to  
intramural injections of L-form bacteria. Brit. J.  
Surg. 61;921.
135. Paganelli, R., Pallone, F., Montano, S., Le Moli, S.,  
Matricardi, P.M., Fais, S., Paoluzi, P., Amelio, R., and  
Aiuti, F. (1985) Isotypic analysis of antibody response  
to a food antigen in inflammatory bowel disease. Int.  
Archs. All. Appl. Immu. 78;81-85.
136. Parish, N.P., Roitt, I.M., and Cook, A. (1988) Phenoty-  
pic characteristics of cells involved in induced  
suppression to murine experimental autoimmune  
thyroiditis. Eur. J. Immunol. 18;1463-1467.
137. Pelletier, R.-M., Nemirovsky, M.S., Calvert, R., and  
Hugon, J.S. (1981) Effects of immunization with Freund's  
complete adjuvant and isologous spermatozoa on the  
seminiferous epithelium and blood-testis barrier in  
guinea pigs. Anat. Rec. 199(2);197-211.

138. Perlmann, P., Hammarström, S., Lagercrantz, R., and Campbell, D. (1967) Autoantibodies to colon in rats and human ulcerative colitis: Cross reactivity with *Escherichia coli* 0:14 antigen. P.S.E.B.M. 125;975-980.
139. Perlmann, P., Hammarström, S., Lagercrantz, R., and Gustafsson, B.E. (1965) Antigen from colon of germfree rats and antibodies in human ulcerative colitis. Ann. N.Y. Acad. Sci. 124;377-394.
140. Perlmann, P., and Holm, G. (1969) Cytotoxic effects of lymphoid cells in vitro. Adv. Immunol. 11;117-193.
141. Perry, L.L., Barzaga, M.E., and Ferguson, T.A. (1988) Modulation of experimental allergic encephalomyelitis with anti-T suppressor factor antibodies. J. Immunol. 141(9);3016-3021.
142. Polcak, J., and Vokurka, V. (1960) Auto-immune reactions in the course of ulcerative colitis. Am. J. Dig. Dis. 5(5);395-405.
143. Prindiville, T., Cantrell, M.C., and Gershwin, M.E. (1988) Generation of monoclonal antibodies to involved ileum of Crohn's disease: Characterization of a panel of antibodies with goblet cell membrane and brush border-specific reactivity. Am. J. Gastroenterol. 83(9);935-942.

144. Rabin, B.S. (1976) Duodenum-, ileum-, and colon-specific antigens. *Int. Arch. All. App. Immunol.* 50;133-141.
  
145. Rabin, B.S., and Rogers, S.J. (1976) Nonpathogenicity of antiintestinal antibody in the rabbit. *Am. J. Path.* 83(2);269-281.
  
146. Raedler, A., Bridow, G., Kirch, W., Thiele, H.G., and Greten, H. (1986) In vivo activated peripheral T cells in autoimmune disease. *J. Clin. Lab. Immunol.* 19-181-186.
  
147. Ramachandar, K., Sachar, D.B., Janowitz, H.D., Forman, S.P., Douglas, S.D., and Taub, R.N. (1974) B lymphocytes in inflammatory bowel disease. *The lancet*, july 6;45-46.
  
148. Rauch, H.C., and Einstein, E.R. (1974) Specific brain protein: A biochemical and immunological review. *Rev. Neurosci.* 7;283.
  
149. Reeves, W.H. (1985) Use of monoclonal antibodies for the characterization of novel DNA-binding proteins recognized by human autoimmune sera. *J. Exp. Med.* 161;18.
  
150. Reinherz, E.L., and Schlossman, S.F. (1980) Regulation of the immune response - inducer and suppressor

- T-lymphocyte subsets in human beings. *New Engl. J. Med.* 303;370-373.
151. Richmann, D.P., Gomez, C.M., Berman, P.W., Burres, S.A., Fitch, F.W., and Arnason, B.G.W. (1980) Monoclonal anti-acetylcholine receptor antibodies can cause experimental myasthenia. *Nature*
152. Roche, J.K., Cook, S.L., and Day, E.D. (1981) Goblet cell glycoprotein: an organ-specific antigen for gut. Isolation, tissue localization and immune response. *Immunol.* 44-799-810.
153. Roche, J.K., Cook, S.R., and Day, E.D. (1981) Cellular cytotoxicity and gastrointestinal inflammation in inbred rats: induction with gut organ-specific antigens. *Immunol.* 44-489-497.
154. Roitt, I.M. (1985) Les théories dominantes en matière de maladies auto-immunes. *Triangle* 25;59-69.
155. Rose, N.R., Accavitti, M., Pydyn, E.F., Leon, M.A., and Brown, R.K. (1982) The use of hybridoma antibodies to probe the antigenic determinants of thyroglobulin. *Adv. Exp. Med. Biol.* 150;23-35.
156. Rose, N.R., Kong, Y.-C.M., Okayasu, I., Giraldo, A.A., Beiseland, K., and Sundick, R.S. (1981) T-cell

regulation in autoimmune thyroiditis. Imm. Rev. 55;299-314.

157. Rose, N.R., and Mackay, I.R. (1985) The Autoimmune Diseases. Rose, N.R., and Mackay, I.R., editors. Academic Press, Inc.
158. Rose, N.R., and Mackay, I.R. (1985) Chap.1 Genetic predisposition to autoimmune diseases. The Autoimmune Diseases. Rose, N.R. and Mackay, I.R., editors. Acad. Press. inc. pp.1-27.
159. Sachar, D.B., Taub, R.N., Brown, S.M., Present, D.H., Korelitz, B.I., and Ianowitz, H.D. (1973) Impaired lymphocyte responsiveness in inflammatory bowel disease. Gastroenterol. 64;203-209.
160. Sachar, D.B. (1985) Contributions of immunology and microbiology to understanding inflammatory bowel disease. Inflammatory Bowel Disease. Experiences and Controversy. Karelitz, Burton and Sohn, N., editors. New York Grune and Statton, Inc.
161. Schachter, H., and Kirsner, J.B. (1980) "Crohn's Disease of the Gastrointestinal Tract". Wiley, New York.
162. Sharratt, M., Grasso, P., Carpanini, F., and Gangolli, S.D. (1970) Carrageenan ulceration as a model for human

ulcerative colitis. The lancet, october 31;932.

163. Shean, F.C., Barker, W.F., and Fonkalsrud, E.W. (1964)  
Studies on active and passive antibody induced colitis  
in the dog. Am. J. Surg. 107;337-339.
164. Shiner, M. (1986) Autoimmunity in gastrointestinal  
diseases. Arq. Gastroenterol. Sao Paulo 23(2);99-103.
165. Shorter, R.G., Cardoza, M.R., Huizenga, K.A., ReMine,  
S.G., and Spencer, R.J. (1969) Further studies of in  
vitro cytotoxicity of lymphocytes for colonic epithelial  
cells. Gastroenterol. 57;30.
166. Shorter, R.G., Huizenga, K.A., and Spencer, R.J. (1972)  
A working hypothesis for the etiology and pathogenesis  
of nonspecific inflammatory bowel disease. Dig. Dis.  
17(11);1024-1032.
167. Shorter, R.G., Huizenga, K.A., Spencer, R.J., Aas, J.,  
and Guy, S.K. (1971) Inflammatory bowel disease.  
Cytophilic antibody and the cytotoxicity of lymphocytes  
for colonic cells in vitro. Am. J. Dig. Dis.  
16(8);673-680.
168. Shorter, R.G., Mc Gill, D.B., and Bahn, R.C. (1984)  
Cytotoxicity of mononuclear cells for autologous colonic  
epithelial cells in colonic diseases. Gastroenterol.

86;13-22.

169. Shorter, R.G., and Shephard, D.A.E. (1975) Special article: Frontiers in inflammatory bowel disease. The poceedings of a conference sponsored by the Mc Reynolds Foundation. Part I. Dig. Dis. 20(6);540-571.
170. Shulman, S. (1971) Thyroid antigens and autoimmunity. Adv. Immunol. 14;85-185.
171. Sidman, C. (1981) Two-dimensional gel electrophoresis. Immunological Methods, Vol. II. Lefkovits, I. and Pernis, B., editors. Academic Press, Inc.
172. Smith, H.R., and Steinberg, A.D. (1983) Autoimmunity - A perspective. Am. Rev. Immunol. 1;175-210.
173. Solomon, G.E. (1976) Autoimmune factors in inflammatory bowel disease. The Mount Sinai J. Med. 43(5);602-624.
174. Sommers, S.C., and Korelitz, B.I. (1975) Mucosal-cell counts in ulcerative and granulomatous colitis. Am. J. Clin. Path. 63;359-365.
175. Stefansson, K., Dieperink, M., Richman, D.P., Gomex, C.M., and Marton, L.S. (1985) Sharing of antigenic determinants between the nicotinic acetylcholine receptor and proteins in Escherichia coli, Proteus



- vulgaris, and *Klebsiella pneumoniae*. Possible role in the pathogenesis of myasthenia gravis. New Engl. J. Med. 312;221-225.
176. Stobo, J.D., Tomassi, T.B., Huizenga, K.A., Spencer, R.J., and Shroter, R.G. (1976) In vitro studies of inflammatory bowel disease surface receptors of the mononuclear cell required to lyse allogenic colonic epithelial cells. Gastroenterol. 70;171.
177. Strelkauskas, A.J., Callery, R.T., Mc Dowell, J., Borel, Y., and Schlossman, S.T. (1978) Direct evidence for loss of human suppressor cells during active autoimmune disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75;5150-5154.
178. Strickland, R.G., and Jewell, D.P. (1983) Immunoregulatory mechanisms in nonspecific inflammatory bowel disease. Am. Rev. Med. 34;195-204.
179. Strominger, J.L. (1986) Biology of the human histocompatibility leukocyte antigen (HLA) system and a hypothesis regarding the generation of autoimmune disease. J. Clin. Invest. 77;1411.
180. Stuart, J.M., and Dixon, F.J. (1983) Serum transfer of collagen-induced arthritis in mice. J. Exp. Med. 158;378.

181. Takahashi, F., and Das, K.M. (1985) Isolation and characterization of a colonic autoantigen specifically recognized by colon tissue-bound immunoglobulin G from idiopathic ulcerative colitis. *J. Clin. Inv.* 76;311-318.
  
182. Talal, N. (1985) Chap.6 Sjögren's syndrome. *The Autoimmune Diseases*. Rose, N.R., and Mackay. I.R., editors. Academic Press, Inc. pp.145-159.
  
183. Talal, N., and Steinberg, A.D. (1974) The pathogenesis of autoimmunity in New Zealand Black mice. *Curr. Top. Micro. Immunol.* 64;79.
  
184. Tan, E.M., Cohen, A.S., Fries, J.F., Masi, A.T., McShane, D.J., Rothfield, N.F., Schaller, J.G., Talal, N., and Winchester, R.J. (1982) The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arth. Rheum.* 25;1271.
  
185. Taylor, K.B., and Thomas, H.C. (1987) Chap.25 Gastrointestinal and liver diseases. *Basic & Clinical Immunology*. 6<sup>th</sup> ed. Stites, Stobo and Wells, editors. Appleton & Lange, ed. pp. 457-469.
  
186. Teitelbaum, D., Webb, C., Arnon, R., and Sela, M. (1977) Strain differences in susceptibility to experimental allergic encephalomyelitis and the immune response to

the encephalitogenic determinant in inbred guinea pigs.  
Cell. Immunol. 29;265-271.

187. Teuscher, C., Blankenhorn, E.P., and Hickey, W.F. (1987) Differential susceptibility to actively induced experimental allergic encephalomyelitis and experimental allergic orchitis among Balb/c substrains. Cell. Immunol. 110;294-304.
188. Teuscher, C., Smith, S.M., Goldberg, E.H., Shearer, G.M., and Tung, K.S.K. (1985) Experimental allergic orchitis in mice. I. Genetic control of susceptibility and resistance to induction of autoimmune orchitis. Immunogenetics 22;323-333.
189. Thayer Jr., W.R. (1975) The immunopathology of intestinal granulomatous disease. Front. Gastrointest. Res. 1;74-124.
190. Theofilopoulos, A.N. (1987) Chap.11 Autoimmunity. Basic & Clinical Immunology, 6<sup>th</sup> Ed. Stites, Stobo and Wells. Appleton & Lange, ed. pp. 128-158.
191. Tomassi Jr., T.B., and Shorter, R.G. (1978) Sec.84 Immunology of the gastrointestinal tract and inflammatory bowel disease. Immunological Diseases, 3<sup>rd</sup> Ed. Vol. II. Samter, M., editor. Little, Brown & Company. pp. 1478-1501.

192. Toullet, F., Voisin, G.A., and Nemirovsky, M. (1973) Histoimmunochemical localization of three guinea-pig spermatozoal autoantigens. *Immunol.* 24;635-753.
  
193. Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76;4350.
  
194. Tzartos, S.J., and Lindstrom, J.M. (1980) Monoclonal antibodies used to probe acetyl cholin receptor structure: Localization of the main immunogenetic region and a detection of similarities between subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77;755-759.
  
195. Unsworth, J., Hutchins, P., Mitchell, J., Phillips, A., Hindocha, P., Holborow, J., and Walker-Smith, J. (1982) Flat small intestinal mucosa and autoantibodies against the gut epithelium. *J. Ped. Gastroenterol. Nut.* 1;503-513.
  
196. Van Den Berg-Loonen, P.M., Dekker-Saeys, A.J., Meuwissen, S.G.M., and Nijenhuis, L.E. (1977) Histocompatibility antigens and other markers in ankylosing spondylitis and inflammatory bowel diseases. *J. Rheum. (supp. #3)*;57-59.

197. Van Den Berg-Loonen, E.M., Dekker-Saeys, B.J., Meuwissen, S.G.M., Nijenhuis, L.E., and Engelfriet, C.P. (1977) Histocompatibility antigens and other genetic markers in ankylosing spondylitis and inflammatory bowel diseases. *J. Immunogenetics* 4;167-175.
198. Vaughan, J.H. (1978) Sec.61. Autoimmune and histocompatibility (HLA)-associated diseases: General considerations. *Immunological Diseases*, Vol. II, 3<sup>rd</sup> Ed. Samter, M., editor. Little, Brown & Company. pp. 1029-1037.
199. Vladutiu, A.O. (1982) Autoimmune thyroiditis: conversion of low-responder mice to high-responders by cyclophosphamide. *Clin. Exp. Immunol.* 47;683.
200. Vladutiu, A.O., and Rose, N.R. (1975) Cellular basis of the genetic control of immune responsiveness to murine thyroglobulin in mice. *Cell. Immunol.* 17;106.
201. Voisin, G.A., Delaunay, A., and Barber, M. (1951) Sur des lésions testiculaires provoquées chez le cobaye par iso- et auto-sensibilisation. *Ann. Inst. Pasteur.* 81;48-63.
202. Voller, A., Bidwell, D.E., and Burek, C.L. (1980) An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies to thyroglobulin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 163;402.

203. Waksman, B.H. (1959) A histologic study of the auto-allergic testis lesion in the guinea-pig. *J. Exp. Med.* 109;311-324.
204. Watson, D.W., Bartnik, W., and Shorter, R.G. (1980) Chap.7 Lymphocyte function and chronic inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Disease*, . 2<sup>nd</sup> Ed. Kirsner, J.B., and Shorter, R.G., editors. Lea & Febiger, Philadelphia. pp. 121-137.
205. Watson, D.W., and Pinedo, G. (1971) Lymphocyte stimulation by colonic and fecal antigens in patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Clin. Res.* 19;177.
206. Watson, D.W., Quigley, A., and Bolt, R.J. (1966) Effect of lymphocytes from patients with ulcerative colitis on human adult colon epithelial cells. *Gastroenterol.* 51(6);985-993.
207. Watson, D.W., Quigley, A., and Bolt, R.J. (1966) The cytotoxicity of circulating lymphocytes from ulcerative colitis patients for human colonic epithelial cells: Disease specificity and relationship to disease activity. *Gastroenterol.* 50;886.
208. Watson, D.W., and Shorter, R.G. (1975) The immunology of ulcerative colitis and Crohn's disease; cell-mediated

- immune responses. Inflammatory Bowel Disease. Kirsner, J.B., and Shorter, R.G., editors. Lea & Febiger, Philadelphia. pp.90.
209. Watt, J., and Marcus, R. (1971) Carrageenan-induced ulceration of the large intestine in the guinea pig. Gut 12;164-171.
210. Weigle, W.O. (1980) Analysis of autoimmunity through experimental models of thyroiditis and allergic encephalomyelitis. Adv. Immunol. 30;159-273.
211. Weigle, W.O. (1978) Chap.20 Immunological tolerance. Immunological Diseases, Vol. I, 3<sup>rd</sup> Ed. Samter, M., editor. Little, Brown & Company. pp. 389-407.
212. Weigle, W.O. (1973) Immunological unresponsiveness. Adv. Immunol. 16;61.
213. Weigle, W.O. (1971) Recent observations and concepts in immunological unresponsiveness and autoimmunity. Clin. Exp. Immunol. 9;437-447.
214. Weigle, W.O., Sieckmann, D.G., Doyle, M.V., and Chiller, J.M. (1975) Possible roles of suppressor cells in immunological tolerance. Transpl. Rev. 26;186.

215. Williams, R.M., and Moore, M.J. (1973) Linkage of susceptibility to experimental allergic encephalomyelitis to the major histocompatibility locus in the rat. *J. Exp. Med.* 138;775-783.
216. Witebsky, E. (1965) Organ-specific autoantibodies. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 124;29-36.
217. Witebsky, E., and Rose, N.R. (1956) Studies on organ specificity: IV. Production of rabbit thyroid antibodies in the rabbit. *J. Immunol.* 76;408-416.
218. Wright, R. (1970) Ulcerative colitis. *Gastroenterol.* 58(6);875-897.
219. Wright, R. (1964) Immunological aspects of ulcerative colitis. D. Phil. Thesis, University of Oxford.
220. Wright, R., and Truelove, S.C. (1966) Auto-immune reactions in ulcerative colitis. *Gut* 7;32-40.
221. Zanetti, M., and Katz, D.H. (1985) Self-recognition, auto-immunity and internal images. *Cur. Top. Mic. Immunol.* 119;111-126.
222. Zeromski, J., Perlmann, P., Lagercrantz, R., Hammars-tröm, S., and Gustafsson, B.E. (1970) Immunological studies in ulcerative colitis: anti-colon antibodies of



different immunoglobulin classes. Clin. Exp. Immunol.  
7;469-475.